

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**VALESCA WEINGARTNER**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MANANASE,  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger***

**CURITIBA**

**2010**

**VALESCA WEINGARTNER**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MANANASE,  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientadora:  
Profa. Dra. Luciana Porto Souza Vandenberghe

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol  
Profa. Dra. Michele Rigon Spier

**CURITIBA**

**2010**

*“Para meus grandes amores: Elisabet,  
Irma e Régis, e a todos que usufruirão  
desta pesquisa.”*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelas bênçãos concedidas.

Agradeço a minha maravilhosa mãe, Elisabet, e à minha avó Irma por todo amor, confiança, incentivo e apoio a mim estendido.

Ao meu amor Régis com quem sei que me tornei uma pessoa melhor. Obrigada por me compreender e aceitar a distância mais uma vez em nossas vidas.

Professora Luciana, sempre presente. A ela devo toda a autonomia que aprendi a ter como pesquisadora. Obrigada pela confiança. Serei eternamente grata e sinto-me honrada em tê-la tido como orientadora.

Professor Soccol, o qual soube identificar a minha força de vontade entre tantos outros desejando o ingresso no Programa. Jamais me esquecerei da oportunidade concedida e de seu contagiante espírito de pesquisador.

Professora Michele, ou simplesmente, Mi. Obrigada pela dedicação e co-orientação de verdadeira mestre, preocupando-se a todo momento com a minha compreensão dos procedimentos realizados.

À futura engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, e mais dedicada estagiária: Thaísa Scheuer. O sucesso certamente será consequência em sua vida. Minha eterna gratidão pela ajuda, companheirismo e amizade. Já sinto saudades....

À Mitiyo, além da amizade, pela atenção e auxílio prontamente dedicados.

À Fernanda Gago, pelos primeiros passos no procedimento de dosagem de açúcares redutores, essencial à pesquisa como um todo.

Ao Professor Júlio, Cristine Rodrigues e Willerson Sturm pelo auxílio nas análises para determinação de biomassa microbiana e respirometria.

Ao Professor Paulo, pelo suporte na caracterização do suporte/substrato.

Ao Professor Luciano Huergo e seus estagiários Marcelo Scarduelli e Lucas José Falarz, exemplos de receptividade. Obrigada por tornar possível a disposição dos equipamentos nas técnicas de elucidação da mananase purificada.

À Susan Karp e Patrícia Charvet, pela amizade e experiência profissional proporcionada pelo SENAI.

Pela atenção e disponibilidade de moradia: Tia Dirce, D. Judi e Sr. Romeu.

À Suzan, Joana, Fer, Mathias, Pepe, Sabrina, Lulu, Sidnei, André Xalalá, Mara, Mário, Ju Oliveira, Arakaki, Carol Tiemi, Cris, Denise, Carlos, Jéferson, Gisele, Belquis e demais colegas de laboratório pelas risadas e companheirismo.

Ao Professor César Augusto Tischer, sua esposa Paula, e meu orientador de graduação Marcus Adonai Castro da Silva pela amizade, palavras de incentivo e torcida pelo meu crescimento profissional.

Aos meus amigos de graduação Aline Fabiani, Bianca, Marquitos, Pretinha, Bolacha, Carla, Lize..... sei que sempre poderei contar com todos!

Às minhas amigas maravilhosas Juliana Maluche Schaeffer e Marina Walendowsky, o caminho teria sido muito mais tortuoso sem vocês, mesmo distantes fisicamente.....

Aos professores Dra. Débora Brand e Dr. Luciano Huergo, por terem aceito o convite para compor a banca avaliadora deste trabalho.

A todos que me confortaram, ajudaram e me incentivaram nos dias que antecederam à minha defesa de mestrado, quando fui assaltada. Em especial, D. Judi, Sr. Romeu, Sr. Rui, D. Noedi, Lilian, Fahrid, Sidnei, Professoras Luciana e Michele, Mitiyo, Cris, Suzan Rossi, Susan Karp, Michelinha, André Xalalá, Gustavo, Celina, Thaís Vagaes, Renata e Régis.

Ao suporte financeiro concedido pelo Programa CAPES/Reuni que possibilitou minha mudança à cidade de Curitiba e subsistência durante os 2 anos de estudo e pesquisa.

*“O saber se aprende com os mestres.  
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”*

*Cora Coralina*

*“Quando a gente sabe que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas...”*

*Luis Fernando Verissimo*

## RESUMO

As mananases são enzimas que clivam as cadeias de mananas, presentes na fração hemicelulósica da parede celular vegetal. Produzidas comercialmente por fermentação submersa (FSm), as mananases possuem aplicações em diversas indústrias: bebidas e alimentos, papel e celulose, têxtil, sabão e detergentes, ração animal, entre outros. A técnica de fermentação no estado sólido (FES) apresenta inúmeras vantagens sob a FSm, principalmente de ordem econômica, uma vez que é possível utilizar resíduos ou sub-produtos da agro-indústria como suporte/substrato para que o processo ocorra. Os principais objetivos deste trabalho foram produzir mananase através da FES com resíduos agroindustriais, dentre eles, cascas de café e cascas de soja, e purificar a enzima obtida. Para tanto, foi realizada uma seleção de diversas linhagens microbianas quanto à produção de mananase, onde duas cepas de microrganismos do gênero *Trichoderma* sp., uma cepa de *Streptomyces* sp. e doze cepas de *Aspergillus niger*, provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, foram testadas. Com tempo de incubação de 144 horas, a 28 °C, *Aspergillus niger* LPB-28 foi a linhagem escolhida para fermentar casca de soja na obtenção da mananase. O processo fermentativo foi otimizado em biorreatores de escala laboratorial (frascos de Erlenmeyer e colunas com aeração forçada). Os melhores rendimentos de mananase (média de 182 U g<sup>-1</sup>) foram obtidos com 96 horas de fermentação a 28 °C em frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão), com 70% de umidade inicial e solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1,0 g/L). O extrato bruto enzimático apresentou também significativa atividade de xilanase (942 U g<sup>-1</sup>). A mananase obtida do extrato bruto se mostrou mais estável a 60 °C e pH 4,0, sendo inibida por todos os íons metálicos testados (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, e Zn<sup>2+</sup>). No período estudado de 720 horas, a atividade mananolítica resistiu sem perdas significativas em todas as condições de armazenamento (25, 4, -20 e -80 °C). O processo de liofilização influenciou positivamente na mananase concentrando sua atividade até 6140 U g<sup>-1</sup>. O Km avaliado foi de 5,25 mg mL<sup>-1</sup> e a Vmáx = 25 µmol min<sup>-1</sup>. A mananase produzida foi purificada por técnicas de ultrafiltração e cromatografia de troca iônica, e identificada como endo-β-1,4-mananase, pertencente à família 5 das enzimas classificadas como glicosil-hidrolases. A massa molecular estimada para a endo-β-1,4-mananase foi de 41,2 kDa.

Palavras-chave: Mananase, *Aspergillus niger* LPB-28, Fermentação no estado sólido, Cascas de soja.

## ABSTRACT

Mannanases are enzymes that cleave mannans backbones, which are found at the hemicellulosic portion on vegetal cell walls. Commercially produced by submerged fermentation (SmF), the mannanases has applications in several industries: beverage and foods, pulp and paper, textile, soap and detergents, animal feed, etc. The solid-state fermentation (SSF) technique offers several advantages, principally of economic order, under SmF, once that is possible employ agro-industrial residues as support/substrate, at the process. The main objectives of this research were produce mannanase using the SSF with agro-industrial residues, into coffee and soybean husks, and purify the enzyme obtained. For both, was realized a screen of several microorganisms about their capability of mannanase production. Two strains of genera *Trichoderma* sp., one strain of *Streptomyces* sp. and twelve strains of *Aspergillus niger*, from Culture Collection of Biotechnological Process Laboratory, were available. At 28 °C in 144 hours of incubation *Aspergillus niger* LPB-28 was the strain choices to ferment the soy bean husks for mannanase synthesis. The fermentative process was optimized in laboratorial scale bioreactors (Erlenmeyer flasks and glass columns with forced air). The mannanase media activity reached at 182 U g<sup>-1</sup> in 96 hours of fermentation at 28 °C, using Erlenmeyer flasks (diffusion aeration), with 70% initial moisture and nutritive solution composed by urea (0.7 g/L) and manganese sulphate (1.0 g/L). The crude enzymatic extract also shows considerable xylanase activity (942 U g<sup>-1</sup>). The mannanase obtained from the crude extract was more stable at 60 °C and pH 4.0, being inhibited by all metal ions tested (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, e Zn<sup>2+</sup>). At the studied period of 720 hours, the mannanolytic activity resisted without significant losses in ever storage conditions available (25, 4, -20 and -80 °C). The lyophilization process influenced positively in mannanase concentration, which activity reached 6140 U g<sup>-1</sup>. The Km available was of 5.25 mg mL<sup>-1</sup> and the Vmax = 25 µmol min<sup>-1</sup>. The mannanase produced was successfully purified by ultrafiltration and ionic exchange chromatography techniques, and identified as endo-β-1,4-mannanase, from 5 glycosyl-hydrolase family. The approximated molecular mass to endo-β-1,4-mannanase was 41,2 kDa.

Key-words: Mannanase, *Aspergillus niger* LPB-28, Solid-state fermentation, Soy bean husks.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Fig.1</b> - Cascas de café (A) e cascas de café moídas (B) .....	35
<b>Fig.2</b> - Cascas de soja (A) e casca de soja moídas (B) .....	38
<b>Fig.3</b> - Equipamento para avaliação da respirometria (A), e biorreatores do tipo coluna em processo de fermentação (B) .....	40
<b>Fig.4</b> - <i>Aspergillus niger</i> : hifas aéreas com esporos reprodutivos (A), e colônia crescida em placa de Petri com ágar glicose, mostrando as hifas aéreas e vegetativas (B) .....	42
<b>Fig.5</b> - Estrutura lignocelulósica de uma fibra vegetal.....	44
<b>Fig.6</b> - Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e as enzimas requeridas para sua hidrólise .....	46
<b>Fig.7</b> - Fotos de ultrafiltros com membranas de diferentes porosidades.....	54
<b>Fig.8</b> - Aparato para cromatografia de troca iônica: bomba peristáltica (A), coletor de frações (B), e formador de gradiente de eluição (C).....	55
<b>Fig.9</b> - Cuba para o gel (mostrado no detalhe) e fonte transmissora de energia elétrica para o processo eletroforético .....	56
<b>Fig.10</b> - Equipamento de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF.....	58
<b>Fig.11</b> - Liofilizador e bandejas com amostras sendo liofilizadas.....	59

### CAPÍTULO I

<b>Fig.1</b> - Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) produzida pelo processo de FES, utilizando cepas de <i>A. niger</i> , cascas de café e solução nutritiva com e sem adição de LBG 2%.....	68
<b>Fig.2</b> - Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) produzida pelo processo de FES, utilizando cepas de <i>A. niger</i> , cascas de soja e solução nutritiva com e sem adição de LBG 2%..	68
<b>Fig.3</b> - Estudo cinético da produção de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) por <i>A. niger</i> LPB-28 e NRRL 599 em FES com casca de soja e solução nutritiva .....	71

<b>Fig.4</b> - Estudo da viabilidade de <i>A. niger</i> LPB-28.....	72
---	----

## CAPÍTULO II

<b>Fig.1</b> - Diagrama de Pareto para o estudo das condições de extração da mananase..	83
<b>Fig.2</b> - Diagrama de Pareto para o estudo de otimização do pH e umidade inicial do processo de FES para produção de mananase .....	85
<b>Fig.3</b> - Efeito das fontes de nitrogênio da solução nutritiva para produção de mananase .....	86
<b>Fig.4</b> - Diagrama de Pareto para a otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES.....	88
<b>Fig.5</b> - Diagrama de Pareto e parâmetros significativos ( $p \leq 0,1$ ) no estudo das concentrações (g/L) de sulfato de manganês, cloreto de cobalto e uréia para produção de mananase por FES.....	90
<b>Fig.6</b> - Gráfico de Contornos para as concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia como compostos da solução nutritiva para produção de mananase por FES.....	91
<b>Fig.7</b> - Gráfico de Pareto mostrando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) nas concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia para produção de mananase por FES ... ..	92

## CAPÍTULO III

<b>Fig.1</b> - FES em colunas de vidro: 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura ..	98
<b>Fig.2</b> - FES em colunas de vidro com análise de $O_2$ e $CO_2$ .....	100
<b>Fig.3</b> - Diagrama de Pareto com os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) nas condições de umidade e aeração para produção de mananase por FES em colunas..	104
<b>Fig.4</b> - Estudo cinético de produção de enzimas em frascos de Erlenmeyer .....	106
<b>Fig.5</b> - Cinética do consumo de açúcares por <i>A.niger</i> LPB-28 em frascos de Erlenmeyer .....	108
<b>Fig.6</b> - Cinética da biomassa de <i>A.niger</i> LPB-28 em frascos de Erlenmeyer.....	108

<b>Fig.7</b> - Estudo da cinética de produção de enzimas em biorreatores do tipo coluna com aeração forçada.....	109
<b>Fig.8</b> - Cinética do consumo de açúcares por <i>A.niger</i> LPB-28 em colunas com aeração forçada .....	110
<b>Fig.9</b> - Cinética da biomassa de <i>A.niger</i> LPB-28 em colunas com aeração forçada.....	110
<b>Fig.10</b> - Evolução da biomassa do fungo <i>Aspergillus niger</i> LPB-28 durante a produção de enzimas realizada em frascos de Erlenmeyer e colunas com aeração forçada .....	111
<b>Fig.11</b> - Evolução da biomassa estimada do fungo <i>Aspergillus niger</i> LPB-28 durante a produção de enzimas .....	112
<b>Fig.12</b> - Consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono durante o processo de produção de mananase por <i>Aspergillus niger</i> LPB-28 .....	113

#### CAPÍTULO IV

<b>Fig.1</b> - Efeito de diferentes pHs e temperaturas no extrato bruto de mananase; (atividade residual, %) .....	120
<b>Fig.2</b> - Efeito dos íons metálicos na atividade de mananase residual (%); porcentagem de erros fixada em 5% .....	122
<b>Fig.3</b> - Efeito na atividade de mananase ocasionado pelas diferentes condições de armazenamento do extrato bruto enzimático .....	123
<b>Fig.4</b> - Efeito do processo de liofilização do extrato bruto enzimático na atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ e $10 \text{ U g}^{-1}$ ) .....	124

#### CAPÍTULO V

<b>Fig.1</b> - Ultrafiltração do extrato bruto enzimático para separação da mananase .....	136
<b>Fig.2</b> - Cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-sepharose, apresentando o pico de atividade mananolítica, densidade óptica (DO) e gradiente linear de eluição...	137
<b>Fig.3</b> - Cromatografia de troca catiônica em resina SP-sepharose, apresentando os picos de atividade mananolítica, densidade óptica e gradiente linear de eluição.....	138

<b>Fig.4</b> - Análise SDS-PAGE da mananase produzida por <i>A. niger</i> LPB-28 e purificada em resina DEAE-sepharose (poço 2), e SP-sepharose (poço 4). O poço nomeado MM corresponde aos marcadores moleculares (Fermentas) utilizados: 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; e 14,4 kDa .....	139
<b>Fig.5</b> - MS espectro de massa dos polipeptídeos derivados da digestão com tripsina da banda protéica MAN.....	140
<b>Fig.6</b> - Panorama protéico obtido para gi210077419 comparando os espectros MS/MS obtidos a partir de MS 1232,74; 2504,26 e 2837,49 .....	141
<b>Fig.7</b> – “Ion score” (245) para o produto gênico gi145236118 identificado como proteína de <i>Aspergillus niger</i> .....	142
<b>Fig.8</b> - Seqüenciamento comparativo entre os dois produtos gênicos obtidos: gi2100774 e gi1452361 .....	142

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tab.1</b> - Enzimas utilizadas em diversos segmentos industriais e suas aplicações .....	27
<b>Tab.2</b> - Vantagens e desvantagens da FES em relação à FSm .....	31
<b>Tab.3</b> - Composição média da casca de soja .....	38
<b>Tab.4</b> - Produção de mananase utilizando processo de FES e/ou <i>A. niger</i> .....	52

### CAPÍTULO I

<b>Tab.1</b> - Avaliação do desenvolvimento das linhagens estudadas de fungos filamentosos, no meio de cultura Ágar LBG 1% .....	67
<b>Tab.2</b> - Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) produzida por linhagens de <i>A. niger</i> em FES utilizando diferentes proporções de cascas de café e de soja, acrescidas de solução nutritiva.....	70
<b>Tab.3</b> - Composição química da casca de soja.....	73

### CAPÍTULO II

<b>Tab.1</b> - Níveis das variáveis estudadas na otimização da extração da mananase .....	78
<b>Tab.2</b> - Níveis das variáveis estudadas na otimização das condições físico-químicas de produção de mananase por FES.....	78
<b>Tab.3</b> - Níveis das variáveis estudadas na seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	79
<b>Tab.4</b> - Níveis das variáveis estudadas na segunda etapa de seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	80
<b>Tab.5</b> - Níveis das variáveis estudadas na terceira etapa de seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	80

<b>Tab.6</b> - Atividade média de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) extraída do meio fermentativo com diferentes soluções. ....	82
<b>Tab.7</b> - Resultados do planejamento experimental fatorial completo $3^{(2-0)}$ , com três repetições do ponto central, para estudo das condições de extração da mananase ....	82
<b>Tab.8</b> - ANOVA da otimização das condições de extração da mananase .....	83
<b>Tab.9</b> - Resultados do planejamento experimental fatorial completo $3^{(2-0)}$ com três repetições do ponto central, para estudo de umidade e pH inicial do processo de FES para produção de mananase.....	84
<b>Tab.10</b> - ANOVA da otimização das condições de pH e umidade inicial do processo de FES para produção de mananase.....	85
<b>Tab.11</b> - Resultados do planejamento experimental Placket-Burmann para otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	87
<b>Tab.12</b> - ANOVA da otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	88
<b>Tab.13</b> - Resultados do planejamento fatorial incompleto $3^{(3-1)}$ com 4 repetições do ponto central, para as várias concentrações (g/L) de sulfato de manganês, cloreto de cobalto e uréia como composição da solução nutritiva para produção de mananase...	89
<b>Tab.14</b> - ANOVA da otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	90
<b>Tab.15</b> - Resultados do delineamento composto central rotacional $2^2$ com 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições do ponto central, das concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia como composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES.....	91
<b>Tab.16</b> - ANOVA das concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia como compostos da solução nutritiva para produção de mananase por FES .....	92

### CAPÍTULO III

<b>Tab.1</b> - Níveis das variáveis estudadas: umidade e taxa de aeração .....	98
<b>Tab.2</b> - Planejamento experimental fatorial completo $2^{(2-0)}$ com duas repetições do ponto central, para estudo de umidade e aeração forçada do processo de FES em colunas para produção de mananase .....	104

<b>Tab.3</b> - ANOVA da otimização das condições de umidade e taxa de aeração forçada para produção de mananase por FES em biorreator do tipo coluna .....	105
<b>Tab.4</b> - pH e $a_w$ do estudo cinético em frascos de Erlenmeyer .....	107
<b>Tab.5</b> - pH e $a_w$ do estudo cinético em biorreatores do tipo coluna com aeração forçada .....	109
<b>Tab.6</b> - Parâmetros cinéticos da produção de enzimas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> LPB-28 .....	113

## CAPÍTULO V

<b>Tab.1</b> - Resultados sumarizados do estudo em batelada para identificação das condições adequadas nas resinas DEAE e SP-sepharose para cromatografia de troca iônica .....	135
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  - alfa

$\beta$  – beta

XIX – séc. 19

XX – séc. 20

ha – hectares

Kg – quilograma

g – grama

mg - miligrama

mL – mililitro

L – litro

® - marca registrada

IUB - União Internacional de Bioquímica

EC - Enzyme Commission

U –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto

$\text{U g}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 g de matéria seca (atividade enzimática)

$\text{U mL}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto por mL (atividade enzimática)

$\text{U mg}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto por mg de proteína (atividade enzimática específica)

Kat – katal

$K_m$  - constante de Michaelis

$V_{\text{máx}}$  – velocidade máxima

LBG- “*Locust Bean Gum*”

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

SDS-PAGE – Sódio-dodecil-sulfato – Poliacrylamide Gel Electrophoresis

MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

TOF/TOF – Time-Of-Flight/ Time-Of-Flight



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
3.1 ENZIMAS .....	23
3.1.1 Atividade enzimática.....	24
3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS .....	26
3.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES) .....	28
3.3.1 Fatores que afetam a FES .....	31
3.3.2 Suportes/substrato empregados em FES.....	33
3.3.2.1 Cascas de café.....	34
3.3.2.2 Cascas de soja .....	36
3.3.3 Biorreatores para FES.....	39
3.3.4 Microrganismos e a produção de enzimas por FES .....	41
3.4 HEMICELULOSES E MANANAS .....	43
3.5 MANANASE .....	47
3.5.1 Aplicações comerciais das mananases .....	48
3.5.2 Produção de mananases.....	49
3.5.3 Purificação da mananase .....	52
3.5.3.1 Ultrafiltração .....	53
3.5.3.2 Cromatografia de troca iônica.....	54
3.5.3.3 Eletroforese com SDS .....	56
3.5.3.4 Espectrometria de massa “MALDI TOF/TOF” .....	57
3.5.3.5 Liofilização.....	59

### **CÁP. I – SELEÇÃO DE SUBSTRATO/SUPORTE E CEPA MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

RESUMO.....	60
1 INTRODUÇÃO .....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4 CONCLUSÕES .....	73

### **CÁP. II – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE MANANASE, OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger* EM FRASCOS DE ERLLENMEYER**

RESUMO.....	75
-------------	----

1 INTRODUÇÃO .....	76
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
4 CONCLUSÕES .....	93

### **CÁP. III – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MANANASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger* UTILIZANDO FRASCOS DE ERLLENMEYER E COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA**

RESUMO .....	94
1 INTRODUÇÃO .....	95
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	103
4 CONCLUSÕES .....	114

### **CÁP. IV – CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO MANANOLÍTICO, OBTIDO POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger***

RESUMO .....	115
1 INTRODUÇÃO .....	116
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	116
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	120
4 CONCLUSÕES .....	124

### **CÁP. V – ESTUDO DOS PROCESSOS DE ADSORÇÃO, RECUPERAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA MANANASE**

RESUMO .....	126
1 INTRODUÇÃO .....	127
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	128
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	134
4 CONCLUSÕES .....	143

<b>4 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>144</b>
----------------------------------	------------

<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>146</b>
----------------------------	------------

<b>6 ANEXOS .....</b>	<b>159</b>
-----------------------	------------

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As enzimas são utilizadas pelo homem para catalisar inúmeras reações há muito tempo, pois se sabe que a produção de vinho, pão e queijo, por exemplo, antecede os tempos bíblicos, embora naquela época não se conhecesse tão profundamente o mecanismo das reações envolvidas no processo de produção desses produtos (HARGER et al., 1982; SPIER, 2005).

À medida que o conhecimento da natureza das enzimas foi se desenvolvendo, extratos obtidos a partir de tecidos animais ou vegetais, e também produzidos por várias espécies de bactérias, fungos e leveduras, as aplicações técnicas para as enzimas foram se aprimorando (LEADLAY, 1993; SPIER, 2005).

Desde então, foram desenvolvidos processos técnicos para a produção de enzimas microbianas em escala comercial. Desde essa época, reconhece-se que as enzimas têm composição protéica e são biocatalisadores responsáveis por uma gama de reações ocorrentes nas células vivas (HARGER, 1982; SPIER, 2005).

Atualmente sabe-se que as enzimas microbianas são aplicadas na indústria de bebidas e alimentos, de sabão em pó e detergentes, na fabricação de papel e tecidos, em sínteses orgânicas, diagnósticos entre outros.

Segundo Pandey et al. (2005) e Szakacs (2004), apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por fermentação submersa, a fermentação no estado sólido representa um método favorável sendo cada vez mais, considerada como uma alternativa para a produção de enzimas com aplicações industriais, pois requerem baixa tecnologia e maior economia de processo quando comparada ao processo que utiliza a fermentação submersa.

Transformar um problema ambiental em alternativa para subsidiar processos que gerem produtos de interesse industrial e que façam a economia girar, é mais um dos vários pontos positivos que a fermentação sólida tem a oferecer pois é capaz de utilizar resíduos ou subprodutos lignocelulósicos provenientes de processos da agroindústria. Cascas de café e cascas de soja são alguns exemplos e fazem com que com que este bioprocessos mereça cada vez mais atenção no meio científico, e lugar de destaque no mundo real.

As mananases são enzimas classificadas como carboidrases, capazes de decompor cadeias de mananas que encontram-se naturalmente presentes na fração

hemicelulósica, componente de diversas espécies vegetais, juntamente com celulose e lignina.

Industrialmente as mananases são utilizadas para os mais diversos fins: ração animal, anti-espessantes, aditivos alimentares que promovem o crescimento de microflora intestinal benéfica, produção de mano-oligossacarídeos, processamento de papel e celulose, processos têxteis, etc. e, dependendo sempre do objetivo final do produto elas se encontram sós ou em conjunto com outras enzimas.

A produção comercial de uma enzima envolve as etapas de produção, separação, recuperação e purificação da enzima, entretanto, no campo científico a produção de uma enzima de origem microbiana é mais trabalhosa uma vez que envolve o estudo das variáveis inerentes não somente à enzima (tais como caracterização, estabilidade e purificação), mas também ao processo fermentativo. Neste caso, têm-se variáveis a serem avaliadas para que sejam utilizadas adequadamente visando a obtenção da melhor atividade da mananase. Tais variáveis incluem a cepa microbiana produtora da enzima; pH, umidade e taxa de aeração do meio fermentativo; composição da solução nutritiva, tempo de fermentação, tipo de biorreator, e composição do substrato/suporte utilizado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo principal a produção e purificação de mananase por fermentação no estado sólido, utilizando resíduos agro-industriais como suporte/substrato.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar cepa(s) produtora(s) de mananase dentre as linhagens de *Streptomyces* sp., *Trichoderma* sp. NRRL-221 e NRRL-193, e *Aspergillus niger* NRRL-593, NRRL-1278, NRRL-599, NRRL-3, NRRL-511, LPB-34, Z-9, 326, 2001, LPB-28, LPB-12 e LPB-08;
- Selecionar substrato(s)/suporte(s) dentre cascas de café (*Coffea arabica*), e cascas de soja (*Glycine max*), para a produção de mananase por fermentação no estado sólido (FES);
- Caracterizar o(s) suporte(s) e/ou substrato(s) selecionado(s) para a produção de mananase por FES;
- Otimizar as condições de extração da enzima mananase do meio fermentativo;
- Otimizar as variáveis físico-químicas do processo produtivo de mananase em frascos de Erlenmeyer e em biorreatores do tipo colunas com aeração forçada com a cepa microbiana e substrato/suporte selecionados;
- Realizar um estudo da cinética de produção de mananase para determinação do tempo do processo;

- Avaliar a estabilidade do extrato bruto mananolítico e caracterizá-lo frente a diversas condições;
- Relacionar as variáveis do processo tais como produção de biomassa, pH, atividade de água, atividades de mananase, celulasas e xilanase, atividade de mananase específica, consumo de oxigênio e produção de gás carbônico, em diferentes biorreatores (frascos de Erlenmeyer e colunas com aeração forçada);
- Purificar o extrato bruto enzimático;
- Determinar a massa molecular e identificar a proteína purificada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os processos biotecnológicos têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionalmente utilizados. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, os quais podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos e/ou subprodutos da agroindústria, disponíveis abundantemente no Brasil (MACIEL, 2006).

As enzimas figuram entre os principais produtos obtidos por processos biotecnológicos, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade e controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. Investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de novas aplicações e de bioprocessos no setor industrial vem aumentando gradualmente. As enzimas estão sendo aplicadas nos mais diversos setores, sobretudo nas indústrias de alimentos, papel, têxtil, animal e farmacêutica, com um mercado em crescente expansão (MACIEL, 2006).

As vantagens do uso de enzimas estão relacionadas ao alto grau de especificidade das reações e ao fato de serem produtos naturais biológicos, contribuindo com a eficiência do processo, podendo ter sua atividade regulada, e ainda atuarem em baixas concentrações sob condições brandas de pH e temperatura (RODRIGUES; SOCCOL, 2009).

Tal interesse justifica-se pela utilização de processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com baixo impacto ambiental e que utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria, contribuindo para a diminuição de resíduos descartados no Planeta.

#### 3.1 ENZIMAS

De acordo com Voet e Voet (2006) e Sant'anna Jr. (2001), as enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos (proteínas) ligados covalentemente por ligações peptídicas e a sua configuração

pode ser dividida em: estruturas primárias (correspondente à seqüência geneticamente determinada desses aminoácidos), secundárias (com interações entre aminoácidos adjacentes que podem levar à formação de arranjos espaciais do tipo  $\alpha$ -hélice ou do tipo  $\beta$ -folha), terciárias (resultante das interações entre aminoácidos, não seqüencialmente próximos, provocando torções e dobramentos de regiões da macromolécula e configurando o sítio catalítico da enzima), e quaternárias (interação entre cadeias polipeptídicas e subunidades distintas ocorrentes em algumas enzimas complexas de regulação).

A conformação e a estabilização da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (SANT'ANNA JR., 2001).

Essa complexa estrutura molecular enzimática é constituída majoritariamente pela parte protéica, porém, a ela podem estar integradas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (co-fatores) de natureza não protéica. Os co-fatores podem ser íons ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , etc.) ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas (NAD, NADP, FAD, etc.) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007; SANT'ANNA JR., 2001).

Conforme Lehninger, Nelson e Cox (2007), as enzimas ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos, acelerando a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, ou seja, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. Embora a maioria das enzimas sejam intracelulares, algumas são extracelulares, isto é, são excretadas para fora da célula viva.

### 3.1.1. Atividade enzimática

A escolha de um método para a determinação da atividade de uma enzima requer conhecimento prévio da faixa de concentração enzimática que permite obter



uma variação linear da concentração do produto (ou substrato) com o tempo, num intervalo que não seja suficientemente grande para que os fatores citados venham a interferir. Podem ser usados métodos variados para avaliar a variação das concentrações, dentre eles os mais diretos (espectrometria, fluorimetria, titulometria) e outros menos (medida da variação da viscosidade) (SANT'ANNA JR., 2001).

A dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações de concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto em condições experimentais estabelecidas (RODRIGUES; SOCCOL, 2009).

Há ainda, o katal (kat) apresentado, por exemplo, por Ademark et al. (1998) para  $\beta$ -mananase, como a unidade internacional de atividade enzimática. O katal é definido como a quantidade de enzima que transforma um mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões.

Em muitas situações emprega-se ainda a determinação da atividade específica, que é expressa em Unidades (U) por massa de proteína. Para a determinação de concentrações totais de proteína, vários são os métodos disponíveis: biureto-reagente alcalino de cobre; Lowry-Folin-Ciocalteau; absorção de raios UV a 280 nm (aminoácidos aromáticos) ou a 205-220 nm (peptídeos); ácido bis-concêntrico; Bradford. Cada um desses métodos baseia-se em princípios diferentes, razão pela qual os resultados obtidos não são iguais e, portanto, não devem ser comparados. Além disso, mesmo que se adote uma única metodologia, o resultado obtido somente expressará a verdadeira concentração de proteínas se a curva de calibração for determinada em solução de proteínas de composição idêntica à solução alvo (LUCARINI; KILIKIAN, 1999; KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

De forma resumida, uma certa variedade das condições de ensaio, bem como de métodos de determinação, é observada para uma mesma enzima, dependendo do produtor ou do pesquisador. Assim, é sempre difícil comparar resultados de

atividade enzimática obtidos por diversos autores, em função da falta de definição de padrões consensualmente aceitos.

### 3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

De acordo com Harger, Sprada e Hiratsuka (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (mananases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulasas, fitases, etc.), de origem fúngica ou bacteriana.

Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana obtidas por processos fermentativos (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Na Tabela 1 estão listadas algumas delas e suas respectivas aplicações.

**Tabela 1.** Enzimas utilizadas em diversos segmentos industriais e suas aplicações

Setor industrial	Classe da enzima	Aplicação
Detergente (lavanderia e louças)	Protease Amilase Lipase Celulase Mananase	Remoção de manchas protéicas Remoção de manchas amiláceas Remoção de manchas lipídicas Limpeza, clareamento da cor, anti-redeposição (algodão) Remoção de manchas de mananas (reaparecimento de manchas)
Amido e combustível	Amilase Amiloglicosidase Pululanase Glicose isomerase Ciclodextrina-glicosiltransferase Xilanase Protease	Amido de liquefação e sacarificação Sacarificação Sacarificação Conversão de glicose em frutose Produção Ciclodextrina Redução da viscosidade (combustível e amido) Protease (nutrição para leveduras - combustível)
Alimentos (incluindo laticínios)	Protease Lipase Lactase Pectina metil esterase Pectinase Transglutaminase	Coagulação do leite, fórmulas infantis (pouco alergênico), sabor Sabor queijo Remoção de lactose (leite) Firmar produtos à base de frutas Produtos à base de frutas Modificar propriedades visco-elásticas
Panificação	Amilase Xilanase Lipase Fosfolipase Glicose oxidase Lipoxigenase Protease Transglutaminase	Maciez e volume do pão, ajuste de farinha Condicionamento de massa Estabilidade e condicionamento de massa (emulsificante <i>in situ</i> ) Estabilidade e condicionamento de massa (emulsificante <i>in situ</i> ) Fortalecimento da massa Reforço da massa, branqueamento de pão Bolachas, biscoitos Massa forte laminada
Ração animal	Fitase Xilanase $\beta$ -Glucanase	Digestibilidade do fitato - liberação de fósforo Digestibilidade Digestibilidade
Bebidas	Pectinase Amilase $\beta$ -Glucanase Acetolactato descarboxilase Lacase	Despectinização, tritramento Tratamento de suco, cerveja de baixa caloria Tritramento Maturação (cerveja) Clarificação (suco), sabor (cerveja), tratamento da rolha de cortiça
Têxtil	Celulase Amilase Pectato liase Catalase Lacase Peroxidase	Acabamento Denim, suavização do algodão Desengomagem Expurgo Branqueamento terminal Branqueamento Remoção do excesso de corante
Papel e celulose	Lipase Protease Amilase Xilanase Celulase	Controle de piches, controle de contaminantes Remoção de biofilme Melhoria dos processos de engomagem, descoloração, drenagem Incremento da ação alvejante Melhoria dos processos de descoloração, drenagem, alteração da fibra
Gorduras e óleos	Lipase Fosfolipase	Trans-esterificação Desengomagem, produção de liso-lecitina
Síntese orgânica	Lipase Acilase Nitrilase	Resolução de alcoóis quirais e amidas Síntese de penicilina semi-sintética Síntese de ácidos carboxílicos enantiopuros
Couro	Protease Lipase	"Unhearing", purga Decapagem
Cuidados Pessoais	Amiloglicosidase Glicose oxidase Peroxidase	Antimicrobiano (combinado com glicose oxidase) Branqueamento, antimicrobiano Antimicrobiano

Fonte: Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002

Partindo do princípio de que, para obtenção de enzimas, o processo fermentativo é o ponto de referência, visto que ele contribui para a produção do produto alvo, podem-se denominar os demais como processos a montante ou “*upstream*”, e processos a jusante “*downstream*” (Harrison et al., 2003).

No caso de produção de enzimas, poucos são os processos prévios à fermentação. Um dos mais importantes é o preparo do inóculo onde, decorrido um tempo conveniente de incubação para crescimento do microrganismo, a cultura microbiana é inoculada no fermentador (PRIEST, 1984; SANT’ANNA Jr., 2001).

Conforme discorre Sant’Anna Jr. (2001), o processo fermentativo em si leva a linhagem microbiana, a qual requer cuidados de estocagem e manutenção muito importantes para a reprodução dos resultados experimentais em trabalhos de pesquisa. Os meios de cultivo utilizados são formulados através da utilização de compostos quimicamente conhecidos (meio sintético) e/ou de matérias-primas naturais, os quais devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e em alguns casos, fatores de crescimento.

A otimização de um meio de cultivo é também, em geral, um processo progressivo de aprimoramento. A influência de certos componentes do meio na produção da enzima-alvo pode ser muito significativa (SANT’ANNA Jr., 2001).

E por último as operações que seguem ao processo fermentativo e dependem da localização da enzima de interesse (intra ou extracelular). Em algumas poucas situações, o caldo fermentado livre de células, sem processamento adicional, é diretamente comercializado. No entanto, na maioria das situações, a enzima de interesse é recuperada do caldo fermentado ou da massa celular e purificada até um certo grau (SANT’ANNA Jr., 2001).

### 3.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

De acordo com Feng et al. (2003) e El-Helow et al. (1997), a produção de enzimas é realizada por ambos processos fermentativos: sólido e submerso. Entretanto a fermentação no estado sólido (FES) vem ganhando renovado interesse empregando principalmente espécies fúngicas (TENGERDY; SZAKACS, 2003; Lu et al., 2003).

A FES é geralmente definida como o crescimento de microrganismos em material sólido (úmido) na ausência ou quase ausência de água livre. Dois termos, fermentação no estado sólido e fermentação no substrato sólido vêm sendo utilizados ambigualmente, porém, é necessário distingui-los: a fermentação com substrato sólido pode ser definida como o processo em que o substrato atua unicamente como fonte de carbono/energia na ausência ou quase ausência de água livre; já a FES denomina qualquer processo de fermentação que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato natural ou inerte que é utilizado como suporte sólido (PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008).

A FES é mais antiga que o próprio homem, sendo, portanto, muito difícil precisar o início desta prática pela atividade humana. Sabe-se, contudo, que várias formas de alimentos utilizando esse processo fazem parte da dieta de diversos povos há muitos séculos. Os processos de FES têm sido utilizados extensivamente desde tempos antigos nos países orientais, asiáticos e africanos para produção de alimentos fermentados, e vêm sendo muito estudados nos últimos anos, por pesquisadores do mundo todo, devido as suas peculiaridades sendo de especial interesse econômico em países com abundante biomassa e resíduos agro-industriais, como o Brasil (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Exemplos de alimentos que de alguma forma utilizaram a técnica da FES há milênios, são encontrados na produção de molho de soja, na China, em 1000 a.C. e na de “*chiang*” (similar ao “*miso*”) entre 2500 e 500 a.C., os quais são obtidos a partir da modificação enzimática do meio utilizando-se o “*koji*”. O “*koji*” consiste numa massa umidificada de um cereal cozido (na maior parte dos casos, arroz) na qual há o crescimento de *Aspergillus oryzae* e a conseqüente produção de um complexo enzimático (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003)

Uma das primeiras referências que se tem sobre o processo em meio sólido no ocidente, além de uma citação da obtenção de queijo roquefort em 100 d.C., data do início deste século, nos Estados Unidos, e está associada ao nome do pesquisador Takamine na produção de “*mold bran*”, similar ao “*koji*”, e consiste basicamente na substituição do arroz por farelo de trigo, e de outros fungos para a obtenção de complexos enzimáticos. Esse estudo visava substituir o malte na indústria de destilados e, até a metade deste século, referindo-se ao continente americano, as pesquisas envolvendo FES, basearam-se em torno da produção de enzimas microbianas (TAKAMINE, 1914; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

No período da Segunda Guerra Mundial, com a produção de penicilina, ocorreu o desenvolvimento de processos envolvendo fermentação líquida em tanques profundos. Desse modo, as pesquisas foram voltadas ao desenvolvimento de projetos de fermentadores em sistemas de fase líquida, com muito poucos estudos empregando a FES (MITCHEL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

No Japão, o processo tradicional “*koji*”, realizado em bandejas de madeira ou bambu, foi sendo aperfeiçoado. Projetaram-se incubadoras automatizadas com controle das condições ambientais, agitação controlada do meio e recuperação do produto final, utilizando-se também linhagens mutantes melhoradas. Esses fatos conduziram o Japão à obtenção de uma tecnologia cada vez mais avançada, em termos de produção por FES (PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008).

Recentemente alguns bioprocessos usando a FES foram desenvolvidos para a produção de produtos químicos a granel e produtos de valor agregado como etanol, proteínas unicelulares, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, etc., sendo que diversos estudos vêm sendo realizados no desenvolvimento de reatores ou conhecimento do metabolismo e condições do processo de FES. Porém, em níveis industriais, o processo submerso continua sendo o principal sistema de geração de produtos obtidos via fermentação, sendo ainda insignificante o número de indústrias que empregam a FES para estes fins. O apelo ambiental dos processos que empregam a FES, aliado ao desenvolvimento de novos modelos de biorreatores, à modelagem e simulação poderá servir de poderosas ferramentas no aumento de sua aplicação industrial (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A FES apresenta diversas vantagens, mas também algumas desvantagens sobre a fermentação submersa (FSm), as quais estão listadas na Tabela 2 (COUTO; SANROMÁN, 2005).

**Tabela 2.** Vantagens e desvantagens da FES em relação à FSm

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Elevada produtividade	Dificuldades de escalonamento
Melhor circulação de oxigênio	Homogeneização de baixa eficiência
Meio de baixo custo	Dificuldade de controle dos parâmetros do processo (pH, aquecimento, umidade, condições nutritivas)
Pouco esforço no processo de <i>downstream</i>	Problemas com acúmulo de calor
Energia e custos reduzidos	Produtos com elevada impureza, elevando os custos de recuperação do produto
Tecnologia simples	
Problemas operacionais escassos	
Reproduz o habitat natural de diversos microrganismos	

Fonte: Couto e Sanromán, 2005

É importante ressaltar que o processo de FES é menos agressivo ao ambiente do que o processo de FSm, e os custos são muito menores devido à eficiente utilização e valor agregado dos resíduos (ROBINSON; NIGAM, 2003), confirmado também no estudo de Castilho, Alves e Medronho (2000), onde uma detalhada análise econômica da produção de lipase por *Penicillium restrictum* em ambos processos FSm e FES, foi apresentada. Eles concluíram que para a produção numa escala de 100 m<sup>3</sup> de lipase concentrada por ano, o investimento necessário para que o processo ocorresse em FSm seria 78% maior do que em FES, onde o custo do produto unitário seria 47% menor que o preço de venda.

Robinson, Singh e Nigam (2001) relatam que o maior obstáculo no uso industrial da FES é a carência de conhecimentos em torno dos vários aspectos do processo e a carência de fermentadores (biorreatores) adequados, tornando a pesquisa em escala laboratorial viável e indispensável para o sucesso do produto.

### 3.3.1. Fatores que afetam a FES

A principal diferença entre a fermentação líquida e sólida é devida ao fato de que, na primeira, a mistura entre os componentes do processo (microrganismos, nutrientes e metabólitos) é homogênea e uniformemente distribuída por todo o fermentador. Esta mistura imperfeita ocorrente na FES, promove a formação de

diferentes camadas em torno da célula microbiana, a qual limita a difusão de nutrientes e metabólitos e também a troca gasosa, afetando o crescimento microbiano (GRIFFIN, 1981; Graminha et al., 2008).

Nesse sentido, o meio sólido pode ser considerado mais heterogêneo em termos de população microbiana e concentração de solutos e, visando a redução dessa heterogeneidade, é recomendado um sistema de homogeneização e aeração forçada para remoção do CO<sub>2</sub>, dissipação do calor e distribuição da umidade por todo o meio fermentativo (GERVAIS; MOLIN, 2003).

A despeito dessas características de FES a baixa atividade de água ( $a_w$ ) do meio sólido influencia os aspectos fisiológicos dos microrganismos, tais como o crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos esporos, bem como a produção e atividade de enzimas e metabólitos. Os esporos fúngicos produzidos em FES são mais estáveis, mais resistentes à desidratação e possuem elevada taxa de germinação (HÖLKER; LENZ, 2005). Isso vem sendo atribuído à elevada hidrofobicidade, maior rigidez da parede celular e menor volume dos conidióforos obtidos com as culturas em FES (Pascual et al., 2000; Munoz et al., 1995).

Outro importante fator em FES é a aeração, a qual desempenha diversas funções: oxigenação, remoção de CO<sub>2</sub>, regulação da temperatura do meio (através da dissipação do calor), distribuição do vapor de água (regulando a umidade), e distribuição de compostos voláteis produzidos durante o metabolismo. A taxa de aeração depende da porosidade do meio; O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, os quais podem ser otimizados para cada tipo de meio, microrganismo e processo (CHAHAL, 1987; Graminha et al., 2008).

A temperatura está diretamente relacionada à  $a_w$  e à aeração. Uma limitação da FES é a dificuldade de remover o excesso de calor gerado pelo metabolismo dos microrganismos, ocasionado pela baixa condutividade térmica do meio sólido. Na prática, a FES requer maior aeração para dissipação do calor, do que uma fonte de oxigênio (Viesturs et al., 1981; Graminha et al., 2008), sendo que o incremento da temperatura no biorreator pode causar desnaturação dos produtos, especialmente substância termolábeis (Santos et al., 2004).

As propriedades intrínsecas das enzimas extracelulares microbianas, como temperatura e pHs ótimos para atividade, termoestabilidade, estabilidade em diferentes faixas de pH, e afinidade pelo substrato também podem ser influenciadas



pelo tipo de processo fermentativo adotado para a obtenção dessas proteínas (ALAZARD; RAIMBAULT, 1981; Graminha et al., 2008).

Para otimizar esses fatores que podem influenciar o resultado final da FES, tais como pH, umidade, temperatura, aeração, composição do meio, entre outros, o planejamento experimental é o diferencial para definir criteriosamente e chegar às condições otimizadas mais rapidamente, a um menor custo e com o suporte estatístico na discussão dos resultados. É uma ferramenta indispensável que nos fornece a segurança para tirar as conclusões sobre o trabalho (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

### 3.3.2. Suportes/substratos empregados em FES

Segundo relatam Pandey e Soccol (1998), é constante o esforço para utilizar resíduos em bioprocessos, seja na forma de suporte e/ou de substrato, entretanto, a seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso da FES em especial, os substratos sólidos devem ser constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água, e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (COSTA, 1996; SPIER, 2005).

Pandey et al. (2000a) relatam ainda que a seleção do suporte/substrato adequado para a FES, depende também de fatores que incluem além do custo, a viabilidade de uso.

Conforme Juhász et al. (2005), o substrato lignocelulósico ideal precisa ser barato, bem processado, avaliado em grandes quantidades e, para que ocorra sua hidrólise e produção enzimática, a composição também precisa ser ajustada.

Pandey et al. (1999) afirmam que os resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para os processos em meio sólido (FES), não havendo exceções para seu uso neste tipo de processo fermentativo e também na produção de enzimas.

Segundo Techapun et al. (2001), resíduos da agricultura são compostos por substâncias naturalmente biodegradáveis. Medeiros et al. (2003) citam a polpa e casca de café, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, como alguns dos

resíduos gerados em grande quantidade durante seus processamentos, alertando para a disposição final que pode causar sérios problemas ao ambiente. Singhanía, Soccol e Pandey (2008) discorrem ainda sobre o uso de outros suportes/substratos: tortas oleosas provenientes de diversas fontes vegetais tais como soja, coco, gergelim, palmiste (óleo de palma), azeitona, algodão, e polpa de diversas frutas (maças, uvas, laranjas, abacaxis, kiwi, e banana).

A opção por estes materiais agroindustriais deve-se ao fato de possuírem as seguintes características: são recursos renováveis; sua produção depende de outra atividade produtiva, muitas vezes é um subproduto ou produto secundário; são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

Frente a tudo isso, a falta de aplicação prática pode deixar de agregar valor a estes resíduos, que poderiam gerar lucros para os mais diversos setores (MACIEL, 2006).

Os materiais que fornecem além da função de suporte todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados ideais devido à sua função também de substrato. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes importantes para o processo encontram-se em concentrações muito baixas, sendo necessária a suplementação do meio (NIGAM; SINGH, 1994; PANDEY et al., 2000a).

Em alguns casos, os substratos, principalmente os de origem lignocelulósica, podem ser submetidos a pré-tratamentos (químicos ou mecânicos) para serem mais facilmente assimilados pelos microrganismos (PANDEY et al., 2000a).

#### 3.3.2.1 Cascas de café

O café (*Coffea* sp.) é um dos “*commodities*” agrícolas mais importantes no mundo. *Coffea arabica* e *Coffea robusta* são as duas principais variedades do gênero cultivadas em todo o mundo, para produção comercial. Anualmente, algo em torno de um milhão de toneladas de café são produzidas em mais de 50 países. Em diferentes estágios a partir da colheita até o processamento e consumo, diversos resíduos como a polpa e a casca, folhas e borra de café são gerados em mais de dois milhões de toneladas por ano (SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de café. Existem duas tecnologias de preparação dos grãos do café: vias úmida e seca. No Brasil, o processo de seleção e descasque do café é feito principalmente por via seca. Este proporciona a migração dos açúcares da polpa para o grão, resultando numa bebida mais encorpada e menos ácida (MACHADO, 2002; SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

Dependendo do método, os resíduos (subprodutos) sólidos obtidos são denominados polpa ou casca (Figura 1).



Fonte: A autora, 2008

**Fig.1.** Cascas de café (A) e cascas de café moídas (B)

A composição da polpa de café difere da composição da casca, embora a natureza dos compostos presentes em ambos resíduos seja muito semelhante. Pode haver diferença na composição percentual dos componentes, dependendo do modo de processamento e eficiência, variedade de culturas, condições de cultivo, como por exemplo, o tipo de solo, etc. (SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

As cascas de café contêm, aproximadamente, em % baseada no peso seco: 55% carboidratos, 10% proteínas, 2% gorduras, 4,5% taninos, 1,3 cafeína e 12% pectina (PANDEY; SOCCOL 1998; Pandey et al.,2000b).

Apesar de várias espécies de bactérias, leveduras e fungos serem cultivados em cascas de café para diversas propostas, os fungos filamentosos, principalmente basidiomicetos, são a escolha preferida e que tem sido mais amplamente empregada. Além do mais, a microflora natural de cascas de café avaliada por Roussos et al. (1995) apresentou uma população de fungos ligeiramente maior que de bactérias e leveduras.

Tradicionalmente, a polpa e cascas de café encontram limitada aplicação em fertilizantes, ração animal, adubo, etc. Estas aplicações utilizam apenas uma fração de toda a quantidade disponível e tecnicamente não são muito eficientes. Tentativas recentes têm focado a sua aplicação como substrato em bioprocessos e vermicompostagem, além de detoxificar este resíduo e aplicá-lo como ração, e também para usá-lo como um eficiente substrato para produção de diversos produtos com valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, componentes aromáticos e de sabor, cogumelos, etc. (Pandey et al., 2000b).

### 3.3.2.2 Cascas de soja

A soja é originária da China, Manchúria e Coréia, e vem sendo utilizada há milênios como um alimento popular. A cultura difundiu-se lentamente no Oriente, sendo atualmente reconhecido o seu importante valor econômico, conquistando hoje um dos primeiros lugares entre as oleaginosas cultivadas (Importação e Comércio do Paraná (Imcopa), 2010).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) (2010), no final do século XIX a soja chegou ao Brasil na condição de forragem para a prática da pecuária e só teve um aproveitamento como planta produtora de grãos para a indústria de alimentação animal e óleo comestível a partir de meados do século XX. Em 1970, a área cultivada era de 1,3 milhões de hectares e já em 1980 teve um incremento surpreendente de 8 milhões de hectares. Atualmente, são 23 milhões de hectares que representam 24% da área mundial plantada, posicionando o Brasil como o segundo maior produtor mundial da oleaginosa.

A última safra de 2009/2010 atingiu a produção recorde de 67 milhões de toneladas. Atualmente, a soja é a principal cultura agrícola do Brasil, em volume e geração de renda, representa 11% das exportações totais, conta com 250 mil produtores rurais em 17 estados e gera 1,5 milhão de empregos diretos e indiretos (ABIOVE, 2010).

Na safra 2008/09, os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 80,5 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2629 Kg por hectares, chegando a alcançar cerca de

3082 Kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja. No estado do Paraná, o segundo maior produtor brasileiro de soja, na safra 2008/09, a produção foi de 9,5 milhões de toneladas, com área total plantada de 4,1 milhões de ha, e produtividade chegando a 2337 Kg/ha (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2010).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2010), a exportação da soja na forma bruta (grãos), gera mais de 5,5 bilhões de dólares por ano e seu processamento local para obtenção de produtos com elevado valor é de suma importância para o desenvolvimento econômico e a geração de empregos no País (Karp et al., aceito para publicação).

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, a soja entra na composição de vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros produtos (Embrapa, 2010).

A proteína de soja é a base de ingredientes de padaria, massas, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês e alimentos dietéticos. A soja também é muito usada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel emulsão de água para tintas (Embrapa, 2010).

Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, também é produzida a lecitina, um agente emulsificante (substância que faz a ligação entre a fase aquosa e oleosa dos produtos), muito usada na fabricação de salsichas, maioneses, achocolatados, entre outros produtos (Embrapa, 2010).

Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja já vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa, além de estar sendo testado em diferentes cidades brasileiras (Embrapa, 2010).

Os derivados da soja como a casca de soja (Figura 2), o óleo de soja, a lecitina de soja e o farelo de soja também são amplamente utilizados para a alimentação animal, principalmente como fonte de fibras e proteínas. Sua principal aplicação é na produção de rações para avicultura, suinocultura, bovinocultura, caprinocultura, ovinocultura e aquíicultura. Neste último, destacam-se os peixes

(como o salmão) e camarões, que recebem o farelo concentrado de soja (Imcopa, 2010).



Fonte: A autora, 2008

**Fig.2.** Cascas de soja (A) e cascas de soja moídas (B)

A cada 100 Kg de farelo de soja produzido 8 Kg de casca de soja são geradas. Com relação às características nutricionais a casca de soja possui alto teor de fibras, porém baixa quantidade de lignina (2%), obtendo-se digestibilidade em torno de 90%. Muitos pesquisadores a classificam como produto intermediário entre concentrado e volumoso, semelhante ao que ocorre a polpa cítrica, desempenhando papel fisiológico de fibra vegetal e funcionando como um grão de cereal em termos de energia. A Tabela 3 apresenta a composição da casca de soja (Portal Veterinária, 2010).

**Tabela 3.** Composição média da casca de soja

Nutriente	Valores Médios
Matéria seca (%)	87,94
Energia bruta (Kcal / Kg)	3632
Proteína bruta (%)	13,17
Extrato etéreo (%)	2,49
Fibra bruta (%)	34,50
Cinzas (%)	3,76
Cálcio (%)	0,44
Fósforo (%)	0,14
Magnésio (%)	0,19
Cobre (mg/kg)	13,09
Ferro (mg/kg)	864,96
Manganês (mg/kg)	30,96
Zinco (mg/kg)	53,20

Fonte: Bunge Alimentos (in Portal Veterinária, 2010)

A inclusão de casca em dietas a base de forragem (como suplemento) gera efeitos benéficos associativos positivos, promovendo o equilíbrio da microflora

ruminal, efeito não observado quando é utilizado, por exemplo, o milho (Portal Veterinária, 2010).

Derivados da soja são também utilizados como combustível e fonte de energia para a indústria. Neste aspecto, destacam-se produtos e subprodutos como a casca, o óleo, o álcool e o melaço de soja (Imcopa, 2010).

As cascas de soja consistem da primeira camada que cobre o grão de soja e são um dos subprodutos/resíduos obtidos no processo de extração de óleo do grão. Para cada tonelada de soja processada, até 3% de cascas são geradas (Zambom et al., 2001) e, apesar dos diversos destinos relatados acima, uma fração deste subproduto é descartado como resíduo no ambiente.

### 3.3.3. Biorreatores para FES

De acordo com Saucedo-Castaneda et al. (1994) e DURAND (2002), os equipamentos empregados em FES podem ser classificados da seguinte maneira: biorreatores estáticos (de leito fixo, bandejas perfuradas) ou agitados (do tipo tambor horizontal ou tambor agitado), biorreatores utilizados na escala laboratorial e na escala piloto/industrial, com ou sem aeração forçada.

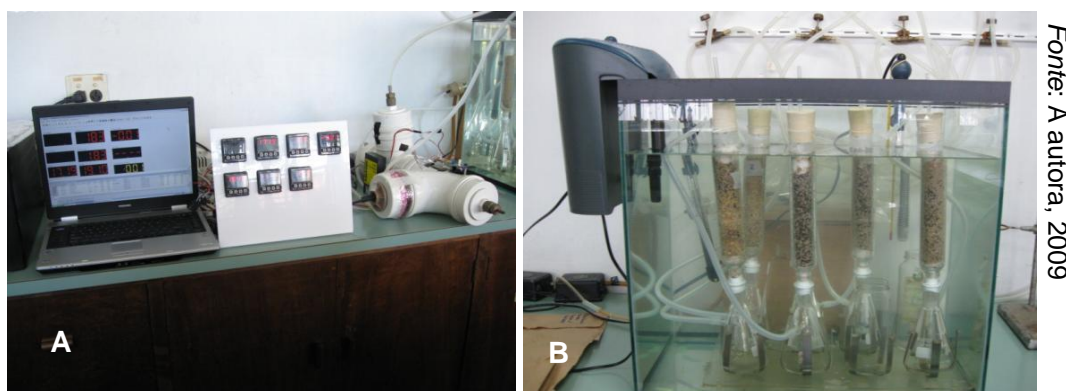
A construção dos biorreatores deve levar em conta as particularidades inerentes da FES: a variedade de materiais que podem ser utilizados como suportes ao crescimento, e suas características como composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água, somados ao fato da baixa umidade do substrato, que confere problemas de transferência de calor ao sistema. Todos os itens citados devem ser levados em consideração no projeto e nas estratégias de controle de um reator que vai operar em um cultivo em estado sólido. A morfologia do fungo, no que diz respeito à presença de hifas septadas ou não (o que confere maior ou menor resistência mecânica à eventual agitação do meio), e a necessidade, ou não, da esterilidade no processo são outros fatores que influenciam o projeto dos biorreatores para FES (DURAND, 2002).

Os biorreatores de escala laboratorial são de simples configuração, baseando-se no monitoramento (na maioria das vezes manual) das variáveis importantes do processo, entre eles frascos de Erlenmeyer, pequenas bandejas perfuradas e do tipo colunas de vidro com aeração forçada (Sturm et al., 2008).



Os frascos de Erlenmeyers são reatores utilizados em escala laboratorial, muitas vezes para início de estudos e otimização dos processos desenvolvidos em escala laboratorial. São feitos de vidro e têm tamanho limitado. Esses frascos são fechados utilizando-se tampões de algodão. O processo ocorre sem agitação e com aeração por difusão. Suas vantagens são: facilidade de manuseio durante as pesquisas, baixo custo; permitem vários testes simultâneos; aeração passiva. Suas desvantagens são: impossibilidade de controle de parâmetros; impossibilidade de regular o processo (SERMANI; TISO, 2008; DURAND, 2002).

Os biorreatores do tipo colunas com aeração forçada constituem-se de vidro com dimensões variadas. Estas colunas são preenchidas com o substrato sólido, o qual é esterilizado separadamente e inoculado. Posteriormente, as colunas são conectadas a borbulhadores de ar, e introduzidas em uma cuba de vidro contendo água com temperatura controlada. A aeração (ar saturado) é bombeada através das colunas, ajustada até o valor desejado de fluxo de ar e controlada com o auxílio de um rotâmetro encaixado na saída de ar da coluna. Esse modelo de biorreator (Figura 3) propicia o estudo da influência da aeração forçada sobre o processo, além da avaliação da respirometria (medidas de  $O_2$  consumido e  $CO_2$  produzidos) do microrganismo, o qual é de extrema importância para o conhecimento de seu metabolismo (STURM; 2004).



Fonte: A autora, 2009

**Fig.3.** Equipamento para avaliação da respirometria (A), e biorreatores do tipo coluna com aeração forçada em processo de fermentação (B)

Devido ao uso de poucos gramas de meio sólido, e pela geometria das colunas, a temperatura do leito de fermentação consegue ser mantida com facilidade, pois a remoção do calor, pela parede da coluna, parece ser eficiente. A



desvantagem deste tipo de reator diz respeito a impossibilidade de retirada de amostra diretamente da coluna, ao longo do cultivo, sendo necessária a amostragem destrutiva, retirando-se uma coluna, em cada intervalo determinado (Sturm et al., 2008).

#### 3.3.4. Microrganismos e a produção de enzimas por FES

A FES reproduz processos microbiológicos naturais como a compostagem e ensilagem (COUTO; SANROMÁN, 2005), onde os microrganismos podem crescer entre fragmentos de substrato, como por exemplo, dentro da matriz ou na superfície do substrato (Rahardjo et al., 2006).

O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ocorrer apenas por um número limitado de microrganismos. Embora algumas bactérias estejam sendo utilizadas, a FES ocorre preferencialmente com leveduras e fungos filamentosos, (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Conforme descrito em Trabulsi e Alterthum (2005), durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais e somente em 1969 passaram a ser classificados em um reino à parte denominado Fungi. Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer outro pigmento fotossintético; não tem celulose na parede celular - exceto alguns fungos aquáticos -, e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas, e a capacidade de armazenar glicogênio, os assemelham às células animais.

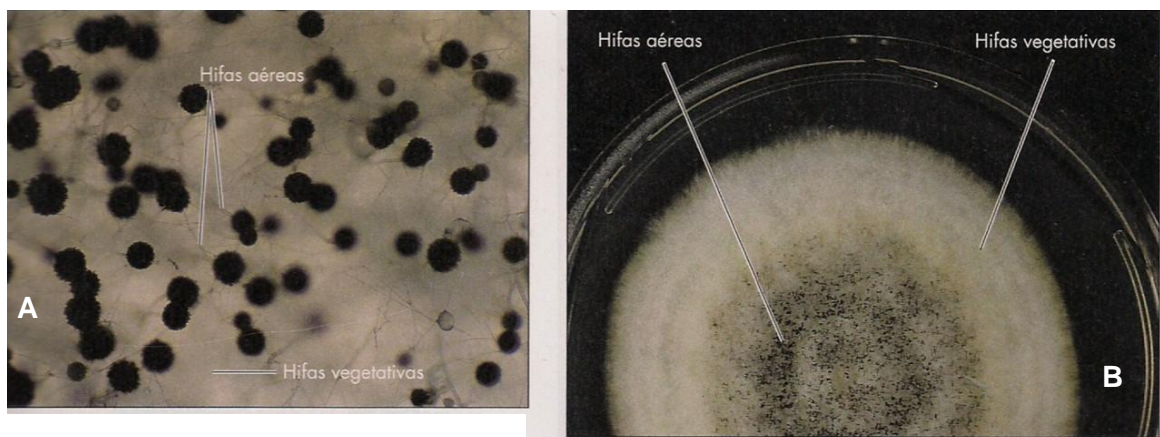
Os fungos são seres eucarióticos (possuem membrana nuclear) com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A identificação das leveduras, assim como a identificação das bactérias envolve testes bioquímicos. Entretanto, os fungos multicelulares são identificados considerando sua aparência física, incluindo características das colônias e dos esporos reprodutivos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação de suas hifas. Além disso, tanto a reprodução sexuada quanto a

reprodução assexuada ocorrem pela formação de esporos. De fato, os fungos são normalmente identificados pelo tipo de esporo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Os esporos de fungos, de qualquer modo, são completamente diferentes dos endósporos de bactérias. Os endósporos de bactérias permitem que as células bacterianas sobrevivam a condições ambientais adversas. Uma única célula bacteriana vegetativa forma um endósporo, que germina para produzir uma única célula bacteriana vegetativa. Esse processo não é reprodução, porque o número total de células não aumenta. Entretanto, após um fungo filamentoso formar um esporo, o esporo se separa da célula parental e germina originando um novo fungo filamentoso (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).



**Fig.4.** *Aspergillus niger*: hifas aéreas com esporos reprodutivos (A), e colônia crescida em placa de Petri com ágar glicose, mostrando as hifas aéreas e vegetativas (B)

Fonte: Tortora, Funke e Case, 2005

Como relata Rahardjo et al. (2006), após a germinação os fungos filamentosos formam hifas tubulares que se alongam até a extremidade e ao mesmo tempo formam novos braços ao longo das hifas. Esta morfologia permite que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e penetrem dentro do mesmo, em busca de nutrientes. As hifas fúngicas formam uma malha porosa tridimensional que é conhecida como micélio.

WARD (1989) salienta que os microrganismos que crescem bem nas fermentações sólidas são geralmente organismos que podem tolerar uma atividade de água baixa. Os microrganismos possuem respostas distintas frente à atividade de água, de forma que quando a  $a_w$  é inferior a 0,95, o crescimento bacteriano é inibido, enquanto os fungos e leveduras podem crescer a uma  $a_w$  de aproximadamente 0,7.

Em aplicações industriais, este processo natural de fermentação pode ser utilizado de forma controlada para obter diversos produtos como alimentos

(laticínios, peixes e produtos cárneos) e bebidas alcoólicas. Nessa via, os microrganismos desempenham o papel mais importante do processo. Em adição, vários produtos de fermentação microbiana também são incorporados aos alimentos na forma de aditivos e suplementos (antioxidantes, flavorizantes, colorantes, preservativos, adoçantes, etc.), havendo um ótimo interesse no desenvolvimento e uso de alimentos naturais e aditivos derivados de microrganismos desde que eles sejam mais desejáveis do que os sintéticos produzidos por processos químicos (COUTO; SANROMÁN, 2005).

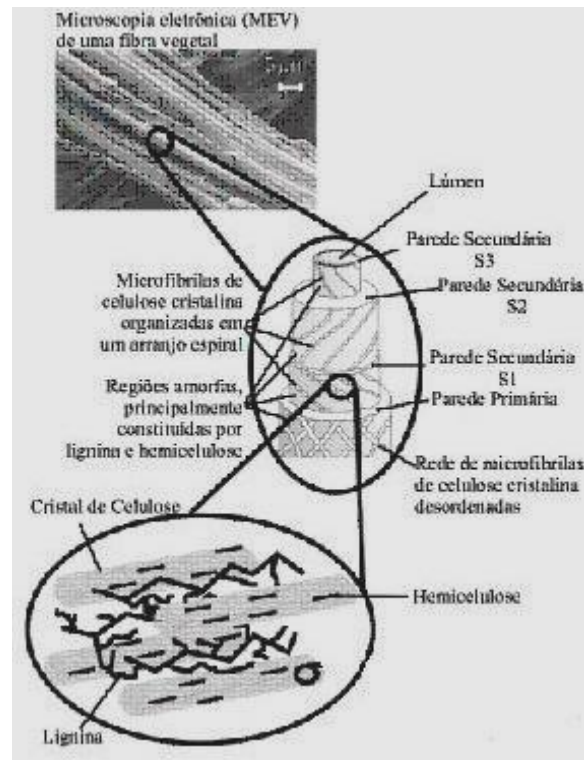
Em FES, a água está presente no substrato sólido cuja capacidade de retenção líquida varia com o tipo de material (GRIGELMO-MIGEUL; MARTIN-BELLOSO, 1999). O crescimento microbiano e o metabolismo que ocorre na fase aquosa são os mesmos que ocorrem na difusão de solutos e/ou substratos. A troca de  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , por outro lado, pode ocorrer em ambas fases, líquida e gasosa. Em FES, a fase líquida é representada por um filme aquoso que circunda as células, enquanto o espaço entre as partículas é ocupado pela fase gasosa.

Segundo Manzanares, Graaff e Visser (1998), a enzima de origem bacteriana apresenta vantagens sobre a enzima de origem fúngica, uma vez que sua produção é maior. No entanto, enzimas fúngicas são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade, sendo então viável a sua produção em grande escala.

De acordo com Pandey (1992), a seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES.

### 3.4. HEMICELULOSES E MANANAS

A estrutura da biomassa lignocelulósica encontrada nas plantas consiste de celulose, hemicelulose e lignina com uma representação aproximada de 2:1:1 (Figura 5).



**Fig.5.** Estrutura lignocelulósica de uma fibra vegetal  
 Fonte: adaptado de Silva et al., 2009

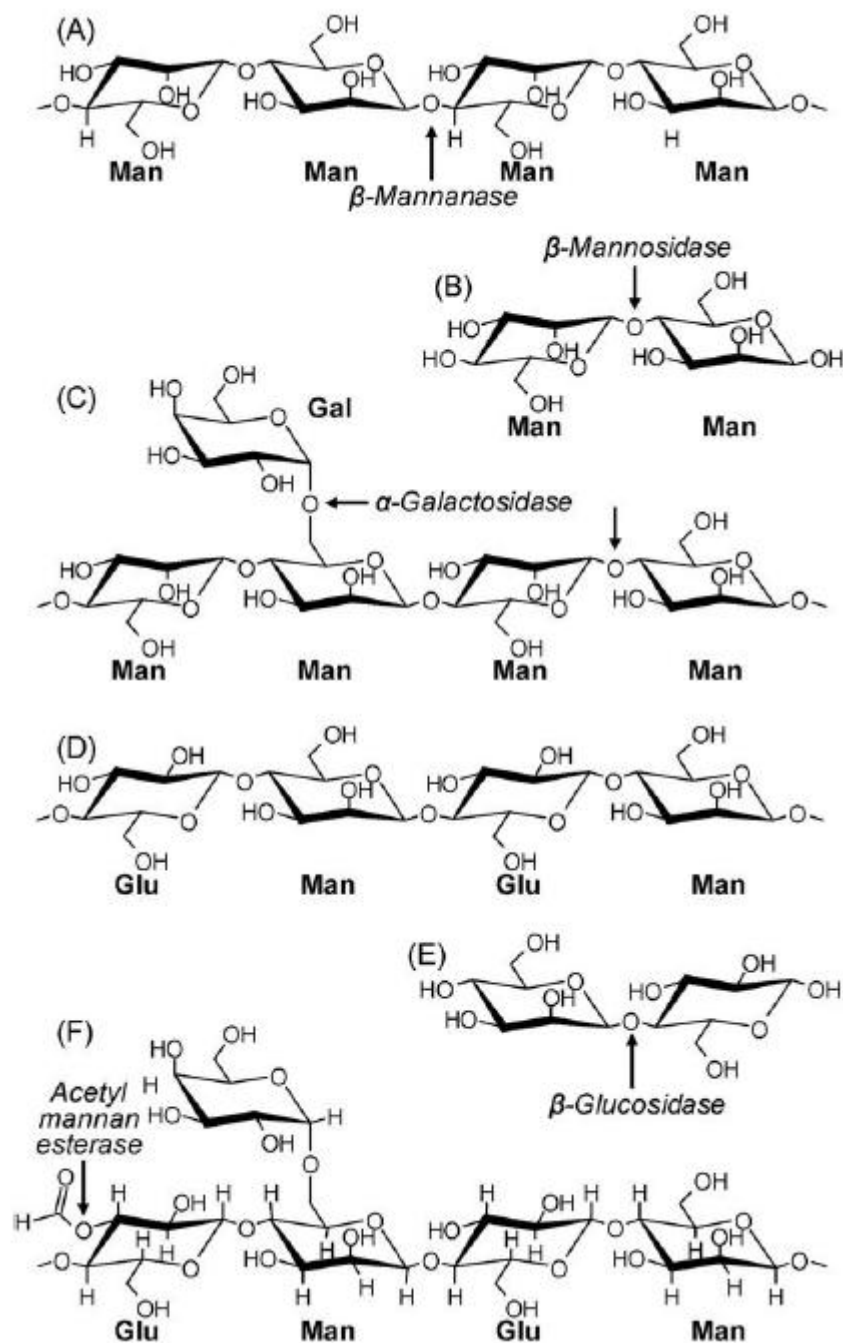
A celulose está presente como cadeia de polissacarídeos compostas de feixes cristalinos compactados, parcialmente insolúveis, fornecendo força e rigidez às paredes celulares, ao passo que a lignina atua como uma barreira amorfa contra a degradação microbiana. Já as hemiceluloses são intercaladas com celulose e lignina, completando a matriz que torna as paredes celulares recalcitrantes à degradação microbiana, e permite ainda flexibilidade suficiente para que ocorra movimentação e crescimento. Como já mencionado, o material lignocelulósico constitui a principal fonte renovável de carbono na natureza, possuindo aplicações como fonte de energia ou matéria-prima para alimentos, rações e indústrias de química orgânica (CHANG, 2007; GRAY; ZHAO, 2006; van Zyl et al., 2010).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos lineares ou ramificados, compostos ao todo por cinco monossacarídeos, comumente encontrados na natureza: D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glicose e L-arabinose (GRAY; ZHAO, 2006; van Zyl et al., 2010). Conforme o tipo de açúcar predominante na principal cadeia de hemicelulose, elas podem ser classificadas como xilanas, mananas, galactanas e arabinanas (BISARIA; GHOSE, 1981). As xilanas compreendem o principal componente hemicelulósico em folhosas e gramíneas, enquanto as mananas são o principal

polissacarídeo hemicelulósico em coníferas, bem como em estruturas especializadas (sementes e frutos de plantas) (Girio et al., 2010; van Zyl et al., 2010).

As mananas também cumprem diferentes funções, sendo componentes estruturais nas paredes celulares de coníferas e apresentando também funções de armazenamento, em sementes (DHAWAN; KAUR, 2007; van Zyl et al., 2010).

Mananas são divididas em dois grupos principais dependendo se sua estrutura que é unida por ligações  $\beta$ -1,4 contendo somente resíduos de D-manose (mananas) ou uma combinação de resíduos de manose e D-glicose (glucomananas). Cada um desses grupos pode ser subdividido de acordo com o número de ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 de galactose nos grupos laterais. Cadeias lineares de mananas e glucomananas contendo mais de 5% (p/p) de D-galactose são denominadas galactomananas e galactoglucomananas, respectivamente (MOREIRA; FILHO, 2008; van Zyl et al., 2010). A estrutura representativa de quatro formas diferentes de mananas está ilustrada na Figura 6, encontrada originalmente em van Zyl et al. (2010).



**Fig.6.** Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e as enzimas requeridas para sua hidrólise. Manana linear (A), galactomanana ramificada (C), glucomanana linear (D), e galactoglucomanana ramificada (F). A estrutura da manana é hidrolizada por  $\beta$ -mananase, ao passo que  $\alpha$ -galactosidase e acetil manana esterase liberam galactose e grupos acetil respectivamente. Os produtos gerados pela ação da  $\beta$ -mananase, manose (B) e glicomanose (E), são em seguida hidrolizados por  $\beta$ -mannosidase e  $\beta$ -glucosidase para finalmente gerarem monossacarídeos de manose, glicose e galactose. *Fonte:* van Zyl et al., 2010

Os grupos laterais de ligações  $\alpha$ -1,6-D-galactose em galactomananas impedem a associação fechada entre polímeros adjacentes, resultando em uma estrutura mais amorfa que retém água e contribui para sua solubilidade em água (DEY, 1978; van Zyl et al., 2010). Elas são comumente encontradas no esdosperma

de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) (Shobha et al., 2005;) e outras sementes de plantas pertencentes à família *Leguminosae*, como a alfarrobeira. A retenção de água pelas galactomananas é particularmente importante para a sobrevivência em longo prazo das sementes de legumes em regiões áridas, enquanto estes polissacarídeos de reserva são mobilizados durante a germinação (Shobha et al., 2005).

### 3.5. MANANASE

De acordo com Moreira e Filho (2008), as principais enzimas envolvidas na hidrólise de mananas e glucomananas lineares, são as 1,4- $\beta$ -D-manana manohidrolases (conhecidas como  $\beta$ -mananases, EC 3.2.1.78), 1,4- $\beta$ -D-manopiranosídeo hidrolases (denominadas  $\beta$ -manosídeses, EC 3.2.1.25) e 1,4- $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolases ( $\beta$ -glicosídeses, EC 3.2.1.21).

As  $\beta$ -mananases são endo-hidrolases, que atacam as ligações glicosídicas internas da cadeia estrutural de mananas gerando  $\beta$ -1,4-mannooligosacarídeos de cadeia curta. As  $\beta$ -manosídeses são exo-hidrolases que geram manose à partir de oligossacarídeos atacando a ligação terminal no final não redutor, bem como, clivando manobiose em unidades de manose (MOREIRA; FILHO, 2008; van Zyl et al., 2010).

Todas as endo-1,4- $\beta$ -mananases clivam a principal cadeia de manana, gerando principalmente manotriose e manobiose (YAMAZAKI; SINNER; DIETRICH, 1976; Gübitz et al., 1996b), enquanto apenas poucas  $\beta$ -mananases também liberam manose à partir de mananas (OOI; KIKUCHI, 1995). Subseqüentemente, manooligosacarídeos como manobiose e manotriose são clivados em manose pelas  $\beta$ -manosídeses. Substitutos de galactose e grupos acetil são removidos por  $\alpha$ -galactosídeses e acetil manana esterases, respectivamente. De acordo com Gübitz et al. (1996a) ocorre ainda a ação de várias  $\alpha$ -manosídeses (Ajisaka et al., 1995; Rastall et al., 1992),  $\beta$ -manosídeses (TAUBKEN; SAUERBREI; THIEM, 1993),  $\alpha$ -galactosídeses (Ajisaka et al., 1988) e  $\beta$ -galactosídeses (Guisan et al., 1993) catalizam a síntese de diversos oligossacarídeos à partir de monômeros (hidrólise reversa) sob determinadas condições.

Algumas  $\beta$ -mananases apresentam atividade de transglicosilação quando incubadas com mano-oligossacarídeos (Harjunpää et al., 1995; Gübitz et al., 1996a). As  $\beta$ -mananases vem sendo classificadas dentro das famílias 5 e 26 das glicosil hidrolases (HENRISSAT; BAIROCH, 1993).

A degradação é afetada pela extensão e padrão de substituição das cadeias estruturais, as quais possuem um efeito inibitório em exo-enzimas. Como já mencionado, a completa hidrólise da estrutura da manana, requer ação sinérgica de endo e exo-hidrolases, juntamente com enzimas que clivam as cadeias laterais para alcançar a completa hidrólise. Ambas heterosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre a cadeia principal e as cadeias laterais) e homosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre as duas cadeias principais ou, entre as duas cadeias laterais) são relatadas na degradação de mananas (MOREIRA; FILHO, 2008; SHALLOM; SHOHAM, 2003; van Zyl et al., 2010).

### 3.5.1. Aplicações comerciais das mananases

Em tempos recentes, é crescente o interesse em celulasas e hemicelulasas devido às várias potenciais aplicações para estes tipos de enzimas.

As  $\beta$ -mananases tem encontrado diversas aplicações industriais, sendo empregadas na preparação de manooligossacarídeos usados como aditivos alimentares sem valor nutricional para o crescimento seletivo da microflora intestinal benéfica em humanos (bifidobacteria e lactobacilos) (Puchart et al., 2004).

Sabe-se que é positivo o efeito das  $\beta$ -mananases na liquefação e extração de frutas (Christgau et al., 1994; Puchart et al., 2004). A redução da viscosidade das galactomananas de reserva é a proposta para sua aplicação na extração do café (Nicolas et al., 1998; Puchart et al., 2004). As preparações à base de café obtidas em conjunção com  $\beta$ -mananases, apresentam melhor volatilidade do aroma, propriedades de sabor e aparência visual da bebida final (NUNES; COIMBRA, 1998).

Entretanto Puchart et al. (2004) relatam que a principal aplicação das mananases pode ser na indústria de papel e celulose. A extração de lignina pode ser aperfeiçoada através do pré-tratamento da polpa com  $\beta$ -mananase sozinha (Gübitz et al., 1997; Suurnäkki et al., 1996) ou combinada com xilanase livre de celulase



(Buchert et al., 1993; Gübitz et al., 1996b). Isso conduz à considerável economia no branqueamento químico e à redução da quantidade de resíduos ecologicamente perigosos e nocivos. Desde que o branqueamento é realizado em elevadas temperaturas e sob condições alcalinas, existe uma forte demanda por  $\beta$ -mananases com propriedades adequadas às condições de aplicação industrial (Puchart et al., 2004).

Fibras dietéticas, a fração predominante da parede celular de plantas, consistem principalmente de carboidratos que não são digeridas por enzimas do sistema digestivo animal e, portanto não podem fornecer calorias (KUNG, 2010). Conforme Lin e Chen (2004), mananases são também utilizadas na bioconversão de biomassa residual em açúcares fermentescíveis (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998), incrementando a matéria-prima da ração animal (RAY; PUBOLS; MGGINNIS, 1982). Elas também possuem potencial aplicação na produção de manooligossacarídeos, que são utilizados como valioso adoçante alimentar (TOMOTARI, 1990).

Cavaco-Paulo (1998) e Jørgensen et al. (2003) afirmam que a mananase também está presente na formulação de detergentes para tecidos.

Os esforços crescentes em torno da diminuição de combustíveis fósseis, a emissão de gases verdes e a poluição do ar causada pela incompleta combustão desses combustíveis também resultou em maior foco na produção de bioetanol à partir de material lignocelulósico (SHEEHAN; HIMMEL, 1999; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001) o qual requer a ação de várias enzimas, dentre elas mananase, para sua completa hidrólise. Contudo, na produção de bioetanol os custos da enzima precisam ser reduzidos e sua eficiência melhorada no intuito de tornar o processo economicamente viável (SHEEHAN; HIMMEL, 1999; Jørgensen et al., 2003).

### 3.5.2. Produção de mananases

Conforme relatam Sachslehner e Haltrich (1999), as mananases são produzidas por vários microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos, ocorrendo também em sementes de plantas terrestres que se encontram em processo de germinação, algas marinhas e animais (DEKKER; RICHARDS, 1976), porém, as mananases são mais freqüentemente isoladas e caracterizadas a partir

de diversos fungos, tais como, *Aspergillus tamaritii* (Civas et al., 1984), *Sporotrichum cellulophilum* (ARAUJO; WARD, 1991), *Thielavia terrestris* (ARAUJO; WARD, 1990), *Trichoderma reesei* (Arisan-Atac et al., 1993; Stålbrand et al., 1993), entre outros.

De acordo com Jørgensen et al. (2003), vários fungos filamentosos são bons produtores de celulasas e hemicelulasas. Em especial o fungo *Trichoderma reesei* que vem sendo estudado mais detalhadamente devido a sua habilidade de secretar grandes quantidades de enzima (acima de 35 g L<sup>-1</sup>) (WOOD, 1985; DURAND; CLANET; TIRABY, 1988). No entanto, *Aspergillus* e *Penicillium* spp. também são capazes de produzir um sistema completo de celulasas e hemicelulasas, mas eles não vem sendo tão investigados e portanto é possível identificar novas enzimas com aplicações interessantes a partir destas espécies (WOOD, 1985; WARD; MOO-YOUNG, 1989; STEINER; SOCHA; EYZAGUIRRE, 1994).

Jørgensen et al. (2003) também relatam que a maior parte dos fungos produz várias enzimas, com atividade enzimática muito semelhante. Por exemplo, *Trichoderma* secreta ao total, quatro endoglucanases, duas celobiohidrolases (TOLAN; FOODY, 1999) e três endoxilanases (XU et al., 1998). Além disso, muitas destas enzimas são ativas para diversos substratos, e portanto, as enzimas tem sido classificadas dentro de famílias de glicosil hidrolases baseando-se na sua seqüência de aminoácidos (HENRISSAT; DAVIES, 1997).

Segundo Magalhães e Milagres (2009), as  $\beta$ -mananases são classificadas dentro das famílias 5 e 26 de glicosil hidrolases (HENRISSAT; BAIROCH, 1993). No total, celulasas e xilanases são classificadas dentro de 14 destas famílias (Sandgren et al., 2001). As enzimas dentro de cada família, não partilham necessariamente as mesmas propriedades, por exemplo, CBHI (Cel7A) e EGI (Cel7B) de *T. reesei* pertencem à mesma família, mas possuem muitas propriedades distintas. No entanto, comparando enzimas de diferentes origens dentro de uma família, é possível revelar similaridades em suas características hidrolíticas (Jørgensen et al., 2003).

De acordo com Ademark et al. (1998), quando cultivados em meio de cultura suplementados com 2% da goma de alfarroba "*Locust Bean Gum*", o fungo filamentoso *Aspergillus niger* produz cerca de 56 nkat mL<sup>-1</sup> de mananase. Neste estudo também foi testada a produção enzimática por *A. niger* em meios de cultura contendo celulose ou glicose como fontes de carbono, porém, a produção de mananase nestes meios não foi detectada. Os autores confirmaram ainda a

degradação de galactomananas em galactose e manose, quando incubada com o filtrado enzimático produzido por *A. niger*. A hidrólise completa deste polímero requer a ação das enzimas  $\beta$ -mananase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -manosidase, as quais são todas produzidas por *A. niger*.

Ferreira e Filho (2004) observaram a produção de mananase por *Trichoderma harzianum* a partir do 6º dia de cultivo em farelo de trigo com atividade máxima de 9 U mL<sup>-1</sup> entre o 8º e 9º dia.

Estudos mais recentes de Lin e Chen (2004), confirmam que, apesar de vários microrganismos serem capazes de decompor mananas, *Aspergillus niger* (Ademark et al., 1998), *Trichoderma reesei* (Arisan et al., 1993), e *Sclerotium rolfsii* (Gübitz et al., 1996ab) detém a maior atenção.

Conforme afirmam Tsang et al. (2009), o ascomiceto *Aspergillus niger* figura numa longa história de uso seguro com aplicações agro-alimentares (Schuster et al., 2002), e está entre os mais importantes microrganismos utilizados em biotecnologia industrial.

*A. niger* é conhecido por secretar uma variedade de enzimas hidrolíticas capazes de degradar biomassa vegetal em açúcares (VRIES; VISSER, 2001). Algumas destas enzimas vêm sendo utilizadas para aplicações industriais (VRIES, 2003), e dezenas de *A. niger* que secretam enzimas estão sendo caracterizados usando métodos bioquímicos e moleculares. Liberações da sequência genômica de linhagens de *A. niger* como, por exemplo, a CBS 153.88 (Pel et al., 2007) tornam possível conduzir pesquisas genômicas para enzimas secretadas adicionalmente, para caracterização bioquímica e para testes que visem a utilização em aplicações industriais (Tsang et al., 2009).

A Tabela 4 apresenta algumas pesquisas realizadas por diferentes autores para obtenção de mananase utilizando processo de FES em escala laboratorial e ou o fungo filamentoso *Aspergillus niger*.

**Tabela 4.** Produção de mananase utilizando processo de FES e/ou *A. niger*

<b>Autor e ano</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Meio e biorreator</b>	<b>Produção de mananase</b>
Heck, Soares e Ayub, 2005	<i>Bacillus circulans</i>	Resíduo fibroso de soja com solução nutritiva em biorreator cilíndrico	0,540 U mg <sup>-1</sup>
Baldrian <i>et al.</i> , 2005	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palha de trigo e meio sintético em colunas de vidro	114,7 mU g <sup>-1</sup>
Magalhães e Milagres, 2009	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	“Chips” de <i>Pinus taeda</i> em biorreator de leite estático	0,25 U g <sup>-1</sup>
Ademark <i>et al.</i> , 1998	<i>A. niger</i>	Meio sintético em frascos agitados	56 nkat mL <sup>-1</sup>
Lin e Chen, 2004	<i>A. niger</i>	Copra desengordurada mais meio sintético em frascos agitados	28 U mL <sup>-1</sup>

### 3.5.3. Purificação da mananase

A escolha das técnicas de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima. Há um grande número de processos de separação que podem ser utilizados para o fracionamento. O processo deve ser cuidadosamente planejado, preocupando-se com a manutenção da estabilidade da proteína, de forma a obter adequada eficiência, velocidade, rendimento e pureza (MARSHAK *et al.*, 1996; SANADA, 2009).

Segundo Neto (2001), o nível de purificação de uma enzima depende primariamente do uso a que se destina. Sendo assim, purificações destinadas a estudos acadêmicos são geralmente extensivas e somente pequenas quantidades de enzima ativa são necessárias; nestes casos custo e tempo têm importância secundária. Enzimas utilizadas em aplicações industriais, como na indústria de alimentos e detergentes são obtidas em grandes quantidades e a pureza é considerada secundária quando comparada aos custos.

A simples secagem de microrganismos cultivados para produção de proteína celular pode ser suficiente para sua comercialização. Caldos enzimáticos impuros, ou parcialmente purificados, podem ser utilizados como catalisadores em conversões químicas industriais. No entanto, uma purificação final é necessária para grande parte dos produtos biotecnológicos, especialmente aqueles de uso farmacêutico, em que a alta pureza é fundamental, obtendo-se quantidades relativamente pequenas. Nesse caso, os produtos devem estar puros, secos,

cristalinos ou amorfos. Para tanto, devem ser submetidos a alguns tratamentos finais como a cristalização ou a liofilização (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001; BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

De forma geral, a purificação desejada é dependente do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final. Perde-se atividade em cada etapa de purificação, por isso, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. A criteriosa escolha dos processos aplicados em cada etapa possibilitará o melhor rendimento com um mínimo de perdas. Considerações como custos de material, tempo de trabalho e exeqüibilidade do processo são importantes em termos de economia (NETO, 2001).

Vários métodos de purificação de mananase têm sido relatados utilizando técnicas como precipitação com sais (Ademark et al., 1998; Gübitz et al., 1996a, Jiang et al., 2006, SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999, ZAKARIA; YAMAMOTO; YAGI, 1998), cromatografia de troca iônica (Ademark et al., 1998, FERREIRA; FILHO, 2004, Gübitz et al., 1996a, Gübitz et al., 1996b, Jiang et al., 2006, MAGALHÃES; MILAGRES, 2009, Puchart et al., 2004, SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999, ZAKARIA; YAMAMOTO; YAGI, 1998), filtração em gel (Ademark et al., 1998, FERREIRA; FILHO, 2004, Gübitz et al., 1996a, Gübitz et al., 1996b, Jiang et al., 2006, SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999, Vieira et al., 2007), ultrafiltração (FERREIRA; FILHO, 2004, Gübitz et al., 1996a, Gübitz et al., 1996b, Jiang et al., 2006, Jørgensen et al., 2003, Puchart et al., 2004, Vieira et al., 2007, ZAKARIA; YAMAMOTO; YAGI, 1998) cromatografia líquida de alta eficiência (Jørgensen et al., 2003), cromatografia de interação hidrofóbica (SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999), e diálise (ZAKARIA; YAMAMOTO; YAGI, 1998).

### 3.5.3.1 Ultrafiltração

A ultrafiltração consiste no transporte de soluções através de membranas com poros de diâmetros de 0,001 a 0,1  $\mu\text{m}$ , sob pressão de transmembrana de 100 a 500 kPa e fluxo de filtrado de 10 a 200  $\text{L}/\text{hm}^2$ , e são usadas para concentrar macromoléculas tais como proteínas ou polissacarídeos (Figura 7). Nesse processo, a água e outras moléculas pequenas (menores que os diâmetros dos poros) passam pela membrana, enquanto que moléculas com tamanhos superiores ao diâmetro

nominal de corte do poro da membrana (“*cut-off*”) ficam retidas (ASENJO, 1990; HARRIS; ANGAL, 1994, KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001)



**Fig.7.** Fotos de ultrafiltros com membranas de diferentes porosidades  
 Fonte: A autora, 2009

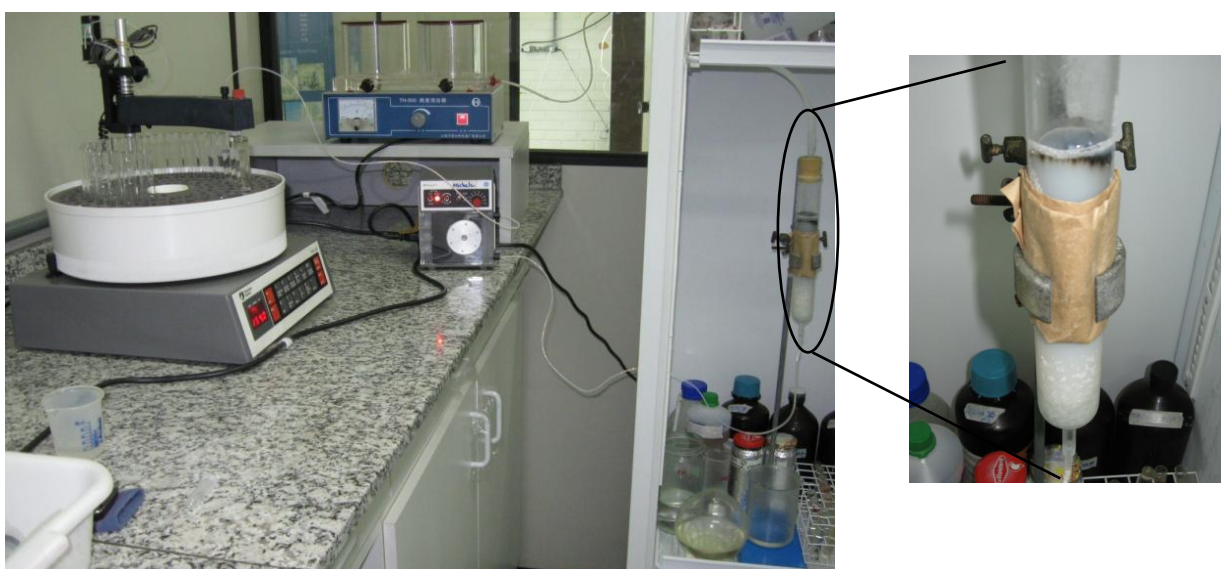
Concentrar proteínas por ultrafiltração tem várias vantagens, a saber: separar bioprodutos de caldos fermentados diluídos, promover a concentração de compostos a baixa temperatura e pressão, possibilitar a retirada de sais e outras moléculas pequenas e manter constante o pH do meio (HARRIS; ANGAL, 1994, KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

A ultrafiltração pode também ser aplicada para a purificação de proteínas de acordo com o tamanho das moléculas. Apesar de ser um método atrativo de purificação, na prática a resolução da técnica é baixa. Isso ocorre porque a distribuição do tamanho dos poros não é uniforme. As moléculas lineares passam mais facilmente pela membrana do que as globulares e a concentração de polarização e o “*fouling*” reduzem o “*cut-off*” da membrana (HARRIS; ANGAL, 1994, KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

### 3.5.3.2 Cromatografia de troca iônica

O princípio básico da cromatografia de troca iônica (Figura 8) baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). Esta técnica envolve

a adsorção a grupos carregados da resina, seguida de sua eluição com fracionamento. Enzimas carregam grupos ionizados em sua superfície, devido principalmente aos resíduos de aminoácidos. O balanço de cargas positivas e negativas depende das quantidades relativas desses grupos carregados e isso varia com o pH. Quando estão em igual número, tem-se o  $P_i$  (ponto isoelétrico). No pH acima do  $P_i$  a enzima possui uma carga negativa e abaixo uma carga positiva. Desta forma, existem matrizes carregadas com grupos positivos como DEAE (dietilaminoetil) chamadas aniônicas e grupos negativos como CM (carboximetil) chamadas de catiônicas (PESSOA Jr., 2001).



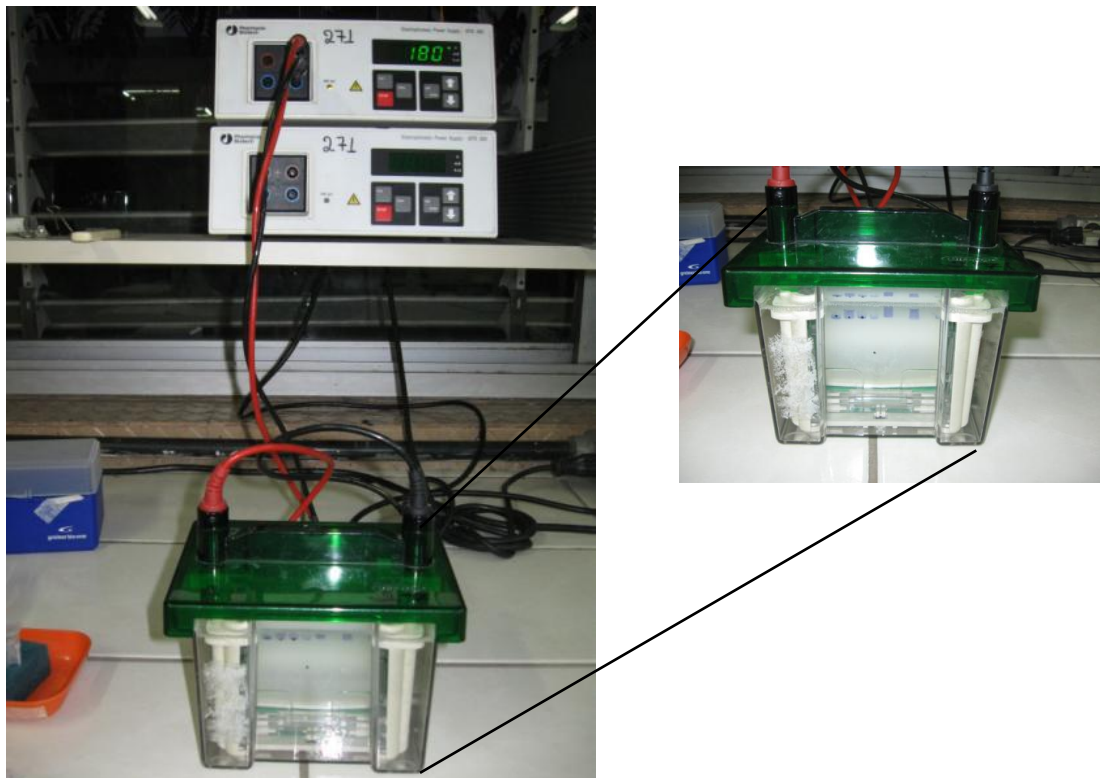
**Fig.8.** Aparato para cromatografia de troca iônica: bomba peristáltica (A), coletor de frações (B), e formador de gradiente de eluição (C). No detalhe e ampliado, a coluna cromatográfica  
*Fonte: A autora, 2010*

O pH pode ser ajustado para regular o grau de adsorção da enzima pela resina. Uma unidade de pH acima ou abaixo do  $p_i$  deve ser utilizada para facilitar a adsorção. A eluição normalmente é mais eficiente quando feita através de um gradiente linear, em que o pH ou a força iônica sofre uma mudança contínua (PESSOA Jr., 2001).

A cromatografia de troca iônica é o método cromatográfico mais utilizado nos processos de purificação de proteínas. Sua popularidade deve-se à sua alta resolução, facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

### 3.5.3.3 Eletroforese com SDS

A eletroforese (Figura 9) é rotina comum no processo de purificação. A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é um procedimento eletroforético que separa as proteínas com base nos seus pesos moleculares. O SDS liga-se às porções hidrofóbicas das proteínas, rompendo suas dobras e permitindo que elas existam em conformação estendida estável. Como resultado, o tamanho do complexo proteína-SDS é proporcional ao seu peso molecular (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).



**Fig.9.** Cuba para o gel (mostrado no detalhe) e fonte transmissora de energia elétrica para o processo eletroforético. *Fonte:* A autora, 2010

Segue-se então a detecção, o qual compreende a coloração das proteínas distribuídas sobre o gel, geralmente com o corante “*Comassie Brilliant Blue*” o azul de Comassie, embora outros corantes possam ser utilizados como, por exemplo, o nitrato de prata. Como resultado visualiza-se uma seqüência de traços (bandas) corados e supõe-se que a cada banda corresponda a uma proteína. A introdução de padrões permite estimar a massa molecular das proteínas da amostra, bem como

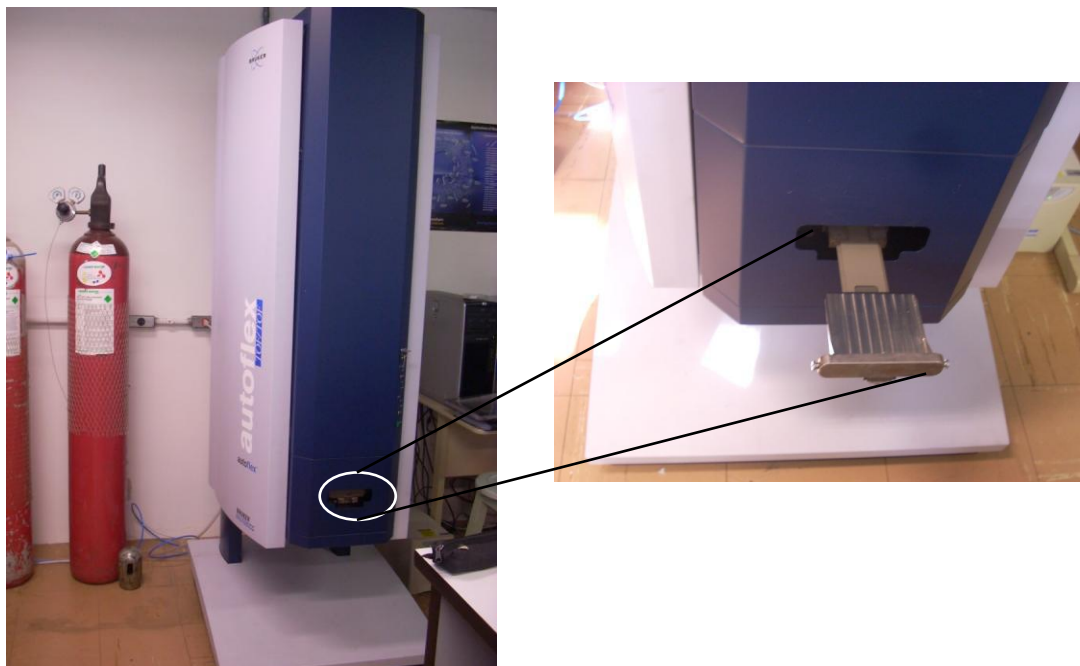


identificar a banda correspondente à proteína alvo. O número de bandas obtidas está diretamente relacionado à pureza da amostra e, portanto, a uma completa purificação corresponde uma única banda, relativa à molécula alvo (LASS, 1989; KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

#### 3.5.3.4 Espectrometria de massa “MALDI TOF-TOF”

De acordo com Harrison et al. (2003), a espectrometria de massa é uma técnica poderosa e muito utilizada na análise de bioprodutos e suas impurezas. O resultado desta análise é a massa da molécula em estudo. Duas formas desenvolvidas e relativamente recentes, denominadas “*electrospray ionization*” (ESI) e “*matrix-assisted laser desorption/ionization*” (MALDI) estendem a aplicação da espectrometria de massa para análise de proteínas e biopolímeros. Esses métodos possuem a acuracidade, sensibilidade, e poder de resolução para detectar modificações pós-translacionais de proteínas e peptídeos.

MALDI ou Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser, trata-se de um método que torna possível a ionização de macromoléculas biológicas tais como as proteínas que são difíceis de serem ionizadas por não serem facilmente decompostas. Tais macromoléculas podem ser analisadas graças à descoberta que permite a irradiação de uma mistura compilada de substâncias (matriz) as quais absorvem feixes de laser e amostras macromoleculares. Combinado com este método, o sistema TOF/MS “*Time-Of-Flight / Mass Spectrometer*” ou Tempo de Vôo / Espectrômetro de Massa - uma forma de detector do espectrômetro de massa - utiliza a diferença de tempo-de-vôo graças às diferenças de tamanho das substâncias ionizadas (proteínas, etc.) (SHIMADZU, 2010). A imagem de um equipamento de MALDI TOF/TOF pode ser visualizada na Figura 10.



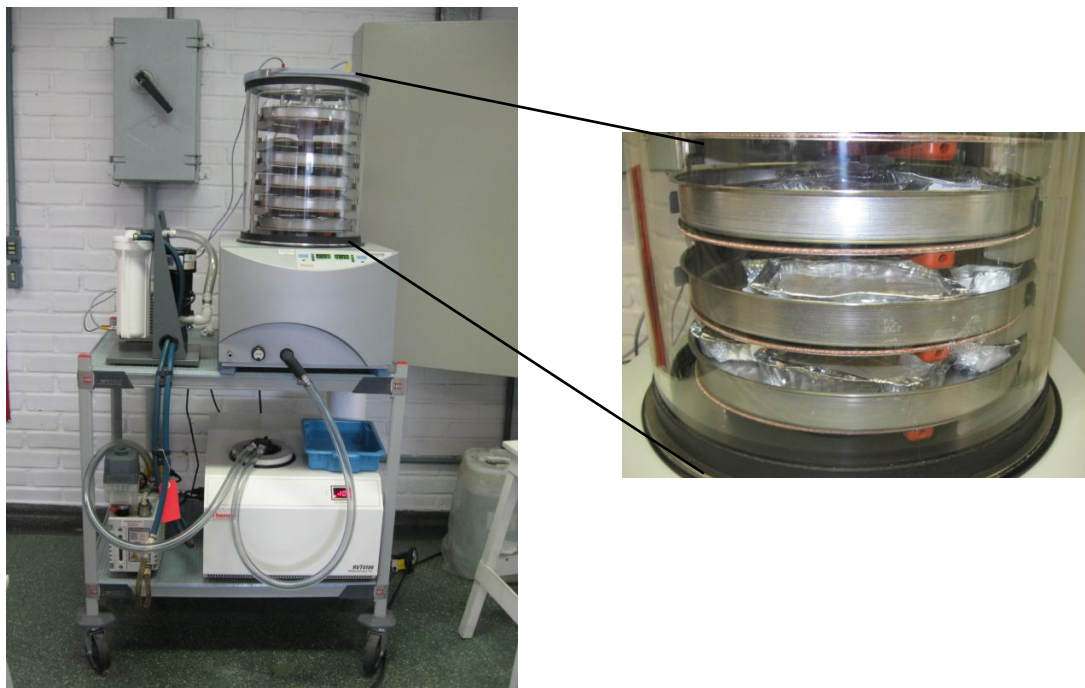
**Fig.10.** Equipamento de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF. No detalhe, o local de inserção da placa com as amostras a serem analisadas. *Fonte:* A autora, 2010

Uma amostra MALDI está em um estado onde é misturado uniformemente com uma matriz de massa. A matriz absorve o laser de nitrogênio (luz ultra-violeta, comprimento de onda de 337 nm) convertendo-o em energia térmica. Ao mesmo tempo, uma pequena matriz é aquecida rapidamente (frações de nanosegundos) sendo vaporizada com a amostra. Diferentes tamanhos de íons positivos e negativos são extraídos da amostra. A velocidade de cada íon após a sua extração é determinada pela Lei da Conservação de Energia, e quanto mais leve o íon, mais rápido este “voa” através do espaço entre a amostra e o detector. Desta forma, a variação das massas dos íons - indicada através da diferença de tempo de voo dos mesmos -, é utilizada na espectrometria de massa, sendo conhecida como TOF/MS (SHIMADZU, 2010).

Com esta técnica, compostos-alvo podem ser identificados em concentrações extremamente baixas (femtomols) e em misturas quimicamente complexas. Uma grande vantagem do MALDI TOF é que o processo de ionização branda causa fragmentação molecular mínima, permitindo a identificação de íons moleculares de analitos, mesmo em misturas (FERREIRA, 2010).

### 3.5.3.5 Liofilização

A liofilização é o processo de remoção de um solvente, tipicamente a água, de uma solução por sublimação. Nesse processo o material é congelado e em seguida submetido à baixa pressão para sublimação da água livre. Durante o congelamento a água se transforma em gelo, num variado, porém, alto grau de pureza e, os solutos são concentrados. Os materiais liofilizados são apresentados na forma de pó e as atividades biológicas se mantêm estáveis por muito mais tempo, quando comparada com a conservação em solução aquosa. Por esse motivo, muitas proteínas comerciais estão disponíveis na forma liofilizada. Porém, se a liofilização não for adequadamente planejada pode ocorrer desnaturação de enzimas (HARRISON, 1994; HARRIS; ANGAL, 1994; KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). Um modelo de liofilizador pode ser visualizado na Figura 11.



**Fig.11.** Liofilizador e bandejas com amostras sendo liofilizadas, mostradas no detalhe  
*Fonte: A autora, 2010*

## CAPÍTULO I

### SELEÇÃO DE SUBSTRATO/SUPORTE E CEPA MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

#### RESUMO

Mananases são enzimas que hidrolizam galactomananas, presentes na parede celular vegetal e podem ser produzidas naturalmente por muitos microrganismos, possuindo diversas aplicações em vários processos industriais. O processo de fermentação no estado sólido (FES) vem recebendo maior atenção nos últimos anos, devido principalmente aos benefícios ambientais ocasionados, uma vez que emprega resíduos agro-industriais como suporte para o processo, os quais podem também servir de substrato. A proposta deste trabalho foi selecionar e caracterizar o melhor resíduo dentre casca de café e casca de soja, em diversas proporções, para servir de suporte/substrato ao processo de FES na produção de mananase. A utilização da possível substância indutora "*Locust Bean Gum*", na produção de mananase também foi avaliada. Quinze cepas microbianas foram testadas quanto à sua capacidade de produção e, com a melhor delas foi realizada uma cinética de produção e um estudo de viabilidade celular. *Aspergillus niger* LPB-28 foi a linhagem selecionada e seu cultivo e tempo de fermentação foi estabelecido em 144 horas com 100% de cascas de soja como suporte/substrato (22,55 U g<sup>-1</sup> de atividade mananolítica).

Palavras-chave: Mananase, *Aspergillus niger*, Cascas de soja, "*Locust Bean Gum*".

## 1 INTRODUÇÃO

Mananases são produzidas por vários microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, ocorrendo também nas sementes em processo de germinação de plantas terrestres, bem como em algas marinhas e animais (DEKKER; RICHARDS, 1976), mas, elas são mais comumente isoladas e caracterizadas a partir de fungos como, por exemplo, *Aspergillus tamaris* (CIVAS et al., 1984), *Sporotrichum cellulophilum* (ARAÚJO; WARD, 1991), *Thielavia terrestris* (ARAÚJO; WARD, 1990), e *Trichoderma reesei* (Arisan-Atac et al., 1993; STÅLBRAND et al., 1993).

Tradicionalmente, o processo de FES é caracterizado pelo desenvolvimento de microrganismos em ambiente com pouca ou nenhuma água disponível, em material insolúvel que age como suporte físico e fonte de nutrientes, porém, Pandey e Soccol (1998) afirmam que é desnecessário combinar os papéis de suporte e substrato, mas indispensável reproduzir as condições de baixa atividade de água e elevada transferência de oxigênio através da utilização de material nutricionalmente inerte, imerso em solução nutritiva.

De acordo com Pandey et al. (2000b), a economia brasileira baseada na agricultura é uma das mais importantes economias mundiais, produzindo café, cana de açúcar, soja, mandioca, frutas, etc. Quase sempre estes produtos são exportados, o que é definitivamente uma excelente contribuição para o desenvolvimento econômico do país. Entretanto, esta excelente produção é responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos que ocasionam sérios problemas ambientais.

Os cinco países maiores produtores de café são: Brasil, Colômbia, Indonésia, México e Costa do Marfim, sendo responsáveis por 60% da produção mundial. Os resíduos mais importantes do tratamento das cerejas de café são a polpa na via úmida e as cascas na via seca; este último representa 80% do café produzido no Brasil (SOCCOL, 2000). Tradicionalmente a casca e polpa de café encontram poucas aplicações tais como fertilizantes e ração de animais, entretanto, utilizam apenas uma fração dos resíduos disponíveis (PANDEY et al., 2001).

A soja é originária da China, Manchúria e Coreia, e vem sendo utilizada há milênios como um alimento popular. A cultura difundiu-se lentamente no Oriente, e atualmente o seu importante valor econômico é reconhecido, uma vez que a soja

ocupa um dos primeiros lugares entre as oleaginosas cultivadas (Importação e Comércio do Paraná (IMCOPA), 2010).

No Brasil, a soja é um dos produtos agrícolas mais importantes, sendo que para 2010 a produção esperada é de aproximadamente 68 milhões de toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010), sua exportação na forma bruta (grãos), gera mais de 5,5 bilhões de dólares/ano e seu processamento local para obtenção de produtos com elevado valor é de suma importância para o desenvolvimento econômico e a geração de empregos no País (Karp et al., aceito para publicação).

As cascas de soja são um dos subprodutos/resíduos obtidos no processo de extração de óleo do grão. Para cada tonelada de soja processada, até 3% de cascas, são geradas (Zambom et al., 2001).

A utilização destes resíduos e subprodutos na forma de substrato e/ou suporte para o processo de FES, objetivando produtos de interesse tecnológico, como as enzimas, além de ser uma alternativa ecologicamente correta, é também lucrativa. Portanto, a proposta deste primeiro Capítulo, foi selecionar o substrato/suporte (dentre cascas de café e de soja), e o melhor microrganismo (avaliando cepas de *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. e *Streptomyces* sp.), para produzir a enzima mananase por fermentação no estado sólido.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LINHAGENS ESTUDADAS

As cepas microbianas (*Aspergillus niger* NRRL-3, 326, 2001, NRRL-599, NRRL-511, LPB-28, LPB-12, LPB-34, 2270, NRRL-593, LPB-08, NRRL-1278; *Streptomyces* sp., e *Trichoderma* sp. NRRL-193, e NRRL-221.) foram obtidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I, localizado na Universidade Federal do Paraná – UFPR, Campus Centro Politécnico, em Curitiba. Eles foram repicados em tubos contendo meio sólido inclinado composto por Ágar Batata Dextrose (para *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp.), e Ágar Extrato de Leveduras (para *Streptomyces* sp.), incubados por até 168 horas em suas

respectivas temperaturas de crescimento (28 °C e 35 °C), e armazenados sob refrigeração a 4 °C.

## 2.2 PRÉ-SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE

O meio Ágar com 1% de LBG (“*Locust Bean Gum*” ou goma de grão de alfarroba), fonte de galactomanana, foi investigado para selecionar os fungos capazes de se desenvolverem neste meio de cultivo pobre em nutrientes. *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. foram inoculados pela técnica de estriamento em superfície em tubos contendo meio sólido inclinado composto por Ágar LBG 1%, e incubados a 28 °C; *Streptomyces* sp. em 35 °C por um período total de 168 horas.

## 2.3 SOLUÇÃO NUTRITIVA

Uma solução nutritiva composta por (g/L): extrato de leveduras, 14,3;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10,0, conforme Puchart et al. (2004), foi utilizada para enriquecer e umedecer os resíduos testados (casca de café e de soja).

## 2.4 SUPORTE/SUBSTRATO PARA FES

As cascas de café (cedidas por Café Damasco<sup>®</sup>), receberam um pré-tratamento à base de imersão em KOH 0,25% e esterilização em autoclave a 100 °C por 45 minutos para eliminação de compostos fenólicos. Após secagem em estufa (80 °C / 24 horas), elas foram moídas em moinho de discos. As cascas de soja (cedidas pela Imcopa<sup>®</sup>) não necessitaram de pré-tratamento.

Ambos os resíduos foram peneirados manualmente para obtenção dos diferentes tamanhos de partículas: maior que 2,0 mm, entre 0,8 e 2,0 mm, e menor que 0,8 mm.

Testes com diferentes proporções de ambos resíduos (25%, 50%, 75% e 100%), para compor o suporte do processo de FES, também foram realizados.

## 2.5 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

O cultivo do inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de Ágar LBG 2%. Após semeadura, os frascos foram incubados a 28 °C durante 168 horas.

Para obtenção da suspensão de esporos utilizada como inóculo, foi preparada uma solução estéril com 50 mL de água purificada, pérolas de vidro, barra magnética e Tween 80 0,01%, a qual foi adicionada ao frasco com o microrganismo cultivado para suspender os esporos por agitação constante durante 10 minutos.

## 2.6 PROCESSO DE FES PARA PRODUÇÃO DE MANANASE

O processo foi conduzido em duplicata, utilizando frascos de vidro (200 mL) com 5 g de casca de café ou casca de soja como suporte, taxa de inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/g de suporte e, umidade inicial de 75% ajustada com a solução nutritiva descrita no sub-item 2.3. Os frascos foram incubados a 28 °C durante 168 horas.

A produção de mananase na presença e ausência de um possível indutor (LBG 2%), também foi avaliada.

Um estudo da cinética de produção de mananase foi realizado com a melhor cepa e substrato onde um frasco foi retirado para análise da atividade enzimática (sub-item 2.8) a cada 24 horas, totalizando um período de 192 horas. No mesmo intervalo de tempo, o pH do fermentado também foi mensurado pelo método potenciométrico.

## 2.7 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Para extração da mananase, 5 g de fermentado foram homogeneizados em agitador magnético por 10 minutos, com 50 mL de água destilada. Esta mistura foi



então filtrada em papel TNT e centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi novamente filtrado em papel filtro Whatman nº 1, e submetido à determinação da atividade enzimática.

## 2.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MANANOLÍTICA

Para determinar a atividade da enzima mananase foram feitas análises em triplicata. Uma alíquota de 0,5 mL do filtrado enzimático diluído (1:5) em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 foi misturada a 0,5 mL de solução de LBG 0,5% e incubado durante 30 minutos em banho-maria a 50 °C, conforme Rättö e Poutanen (1988). Os açúcares redutores liberados foram quantificados após a adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo, os quais permaneceram por 5 minutos em banho de ebulição (MILLER, 1959). A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (540 nm) e os resultados foram expressos em U g<sup>-1</sup> de matéria seca.

## 2.9 VIABILIDADE CELULAR

Para o teste de viabilidade da cepa selecionada, o inóculo foi preparado conforme o sub-item 2.5, e incubado a 28 °C por 216 horas. A cada 24 horas, um frasco de Erlenmeyer foi retirado e então foi obtida uma suspensão dos esporos.

Com auxílio da câmara de Neubauer, foi determinada a concentração de esporos/mL. Em seguida, foram realizadas diluições para inóculo pelo método Pour-plate (1,0 mL) em placas de Petri contendo Ágar LBG 2% (duplicata). As placas foram incubadas a 28 °C por 44 horas, momento em que o crescimento foi interrompido para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

## 2.10 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE/SUBSTRATO SELECIONADO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE

O suporte/substrato selecionado para produção de mananase pelo processo de FES foi caracterizado físico-quimicamente.

A umidade (termogravimétrico), cinzas (termogravimétrico) e proteínas (método de Kjeldahl) foram analisadas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SES, 1985). A quantificação dos açúcares fermentescíveis (totais e redutores) foi realizada conforme a metodologia de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). As medidas de pH foram realizadas pelo método potenciométrico e a determinação do teor de fibra bruta segundo a AOAC International (1990).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PRÉ-SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE MANANASE

Quinze cepas microbianas, incluindo cepas de *Aspergillus niger* (doze), *Trichoderma* sp. (duas) e *Streptomyces* sp. (uma), foram testadas quanto ao seu crescimento em meio de cultura Ágar LBG 1%. As linhagens de *A. niger* se desenvolveram melhor no período de tempo compreendido em 168 horas, conforme pode ser observado na Tabela 1, assim, as doze cepas deste gênero foram escolhidas para a continuidade do presente estudo.

**Tabela 1.** Avaliação do desenvolvimento das linhagens microbianas estudadas no meio de cultura

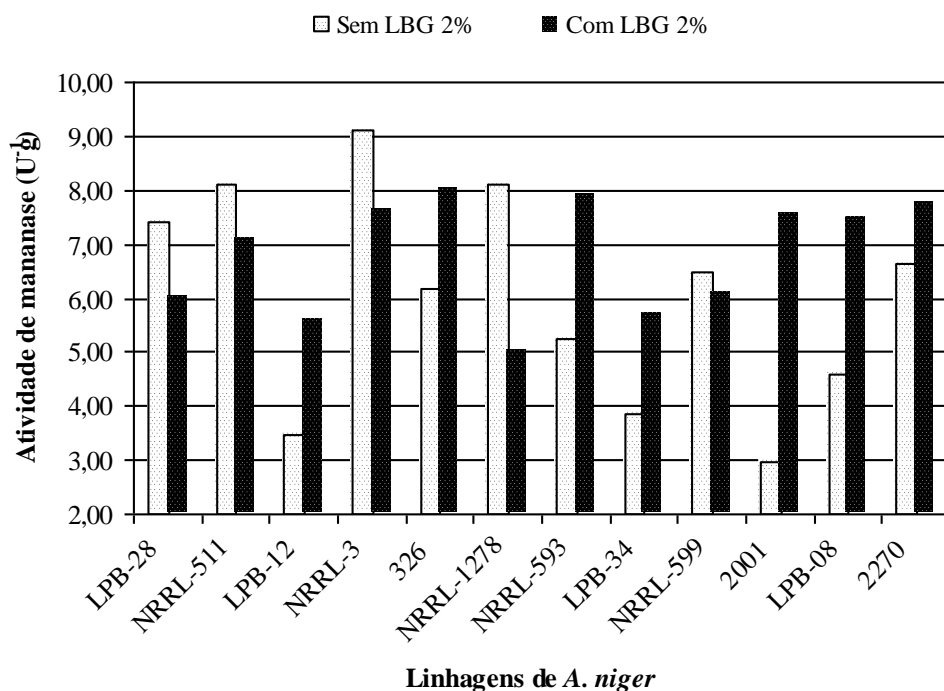
Ágar LBG 1%	
Linhagem	Crescimento
<i>A. niger</i> NRRL-593	+++
<i>A. niger</i> NRRL-1278	+++
<i>A. niger</i> NRRL-599	++
<i>A. niger</i> NRRL-3	++
<i>A. niger</i> NRRL-511	++
<i>A. niger</i> LPB-34	++
<i>A. niger</i> Z-9	++
<i>A. niger</i> 326	++
<i>A. niger</i> 2001	+++
<i>A. niger</i> LPB-28	+++
<i>A. niger</i> LPB-12	+++
<i>A. niger</i> LPB-08	+++
<i>Trichoderma</i> sp. 221	+
<i>Trichoderma</i> sp. 193	+
<i>Streptomyces</i> sp.	+

+: desenvolvimento ruim a razoável; ++: bom desenvolvimento; +++: excelente desenvolvimento

### 3.2 ESTUDO DA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANANASE COM LBG 2%

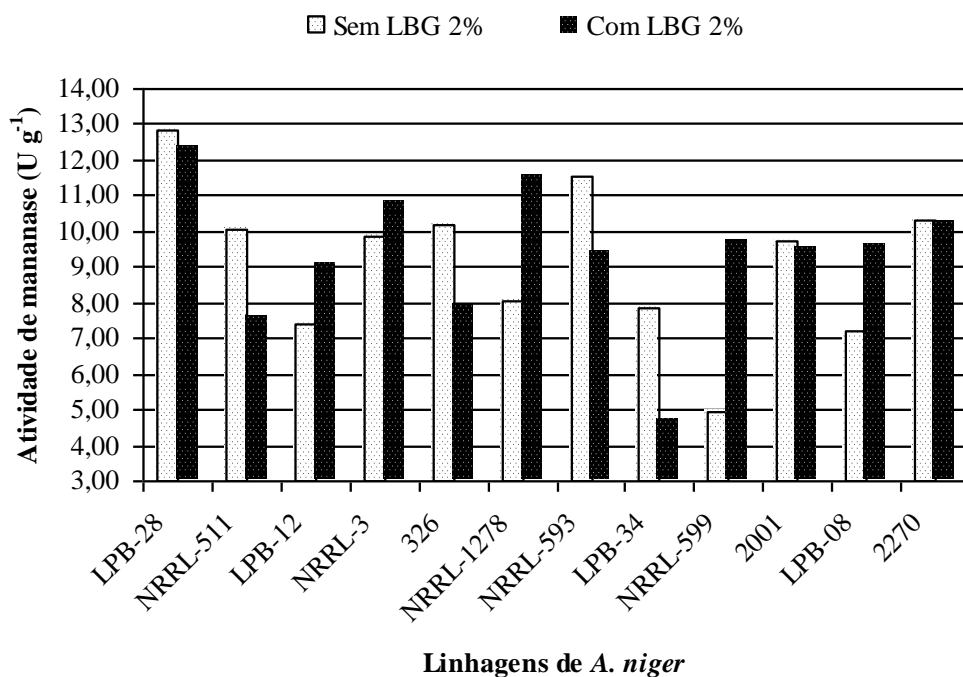
As doze linhagens de *A. niger* foram testadas em FES utilizando cascas de soja e de café como suporte com e sem a fonte de galactomanana LBG 2%, adicionada à solução nutritiva.

Com a casca de café como suporte/substrato (Figura 1), as melhores produções de mananase foram obtidas quando utilizado LBG 2%, com destaque para as cepas NRRL-3, 326, NRRL-593, 2001, LPB-08 e 2270, chegando próximo a  $8 \text{ U g}^{-1}$ , porém, a melhor produção ( $9,13 \text{ U g}^{-1}$ ) foi alcançada com a cepa NRRL-3 sem adição de LBG 2%.



**Fig.1.** Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) obtida pelo processo de FES, utilizando cepas de *A. niger*, cascas de café e solução nutritiva com e sem adição de LBG 2%

Os resultados da produção de mananase utilizando cascas de soja por FES (Figura 2) foram mais satisfatórios e a maior parte das cepas de *A. niger* produziu maiores atividades enzimáticas do que com a casca de café, sem a adição de LBG 2% ao meio fermentativo, com destaque para a cepa LPB-28 ( $12,84 \text{ U g}^{-1}$ ).



**Fig.2.** Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) obtida pelo processo de FES, utilizando cepas de *A. niger*, cascas de soja e solução nutritiva com e sem adição de LBG 2%

Ademark et al. (1998) avaliaram a produção de mananase em meio sintético, suplementado com celulose, ou glicose, ou LBG 2% e, este último foi responsável pelas maiores atividades de mananase ( $56 \text{ nkat mL}^{-1}$  ou  $3,35 \text{ U mL}^{-1}$ ) produzida por *A. niger* ATCC-46890. Tal resultado foi inferior ao obtido com a cepa *A. niger* LPB-28 utilizando somente cascas de soja e solução nutritiva:  $4,9 \text{ U mL}^{-1}$ , o que confirma a eficiência deste substrato/suporte e linhagem fúngica, para a produção de mananase por FES.

Entretanto, de acordo com Pandey et al. (1999), a natureza do suporte sólido empregado é o fator mais importante que afeta o processo de FES. Sua escolha depende de vários fatores, sendo os principais relacionados com custo e disponibilidade.

Geralmente, partículas pequenas promovem grande área de superfície para os microrganismos degradarem, porém se forem partículas muito pequenas, o resultado pode acabar em aglomeração do substrato e pouco crescimento microbiano. Em contraste, partículas grandes promovem melhor aeração, mas, limitada superfície para ataque microbiano (PANDEY et al., 1999) e, por essa razão, o tamanho intermediário das partículas (entre 0,8 e 2,0 mm) foi o escolhido para que o processo fermentativo ocorresse.

### 3.3 SELEÇÃO DO SUPORTE/SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

As melhores atividades de mananase foram obtidas anteriormente com casca de soja sem adição de LBG 2%. Entretanto, esses resultados não foram tão diferentes dos obtidos com o uso da casca de café na presença de LBG 2%. Por isso, optou-se por dar continuidade ao estudo avaliando diferentes proporções de misturas das cascas (café e soja) sem a galactomanana de LBG. Estes resultados são apresentados na Tabela 2, onde os mais expressivos estão destacados em negrito.

Quando comparado a utilização da mistura dos substratos/suportes, com o processo utilizando apenas cascas de café ou cascas de soja, as atividades mananolíticas chegam a dobrar quando provenientes deste último.

A atividade máxima atingida foi de 21,97 U g<sup>-1</sup> com casca de soja contra 10,30 U g<sup>-1</sup> em casca de café com a cepa NRRL-599. A cepa LPB-28 também apresentou bons resultados (19,98 U g<sup>-1</sup>) com o uso de casca de soja.

Como pode ser observado ainda na Tabela 2, a casca de soja foi responsável pelas melhores atividades de mananase quando empregada com 100% ou 75% da composição do suporte para o meio fermentativo. Uma ótima vantagem sobre a casca de café é que ela não requer pré-tratamento para posterior utilização.

Sendo assim, a casca de soja e as cepas NRRL-599 e LPB-28 foram selecionadas para os estudos seguintes.

**Tabela 2.** Atividade de mananase (U g<sup>-1</sup>) produzida por linhagens de *A. niger* em FES utilizando diferentes proporções de cascas de café e de soja, acrescidas de solução nutritiva

Linhagem <i>A. niger</i>	100% CC	100% CS	50% CC + 50% CS	25% CC + 75% CS	25% CS + 75% CC
NRRL-3	7.87	16.53	15.16	17.02	13.59
NRRL-1278	8.23	16.47	13.77	14.52	13.34
<b>LPB-28</b>	9.37	<b>19.98</b>	16.93	<b>18.87</b>	10.50
<b>326</b>	2.48	15.09	12.52	<b>18.05</b>	7.34
<b>NRRL-599</b>	10.30	<b>21.97</b>	11.97	16.25	13.31
NRRL-593	7.75	15.54	12.23	13.71	11.11
LPB-08	6.82	14.61	11.22	12.12	8.99
LPB-70	9.91	17.45	9.61	12.85	12.96

CC: casca de café; CS: casca de soja

A casca de café juntamente com o fungo do gênero *Aspergillus* possuem melhor interação para outras aplicações como observado por Brand et al. (2000) na detoxificação de cascas de café por fungos filamentosos como *Phanerochaete*, *Rhizopus* e, *Aspergillus* sp., sendo este último o mais eficiente na degradação da cafeína, devido à grande formação de biomassa. No estudo realizado por Vandenberghe et al. (2000), para produção de ácido cítrico, o fungo *A. niger* também mostrou afinidade com cascas de café, além de bagaço de cana e mandioca.

A atividade mananolítica obtida pode ser baixa quando comparada com outras linhagens de *A. niger*, como a obtida por Lin e Chen (2004): 24 U mL<sup>-1</sup> contra 3,3 U mL<sup>-1</sup> (a melhor atividade obtida no presente estudo, utilizando esta unidade de medida). No entanto, é importante lembrar que os resultados aqui apresentados são provenientes de um processo de FES com resíduos da agroindústria, cujas condições físicas e químicas ainda não foram otimizadas e que podem interferir na produção da enzima. Procedimentos de concentração e purificação enzimática

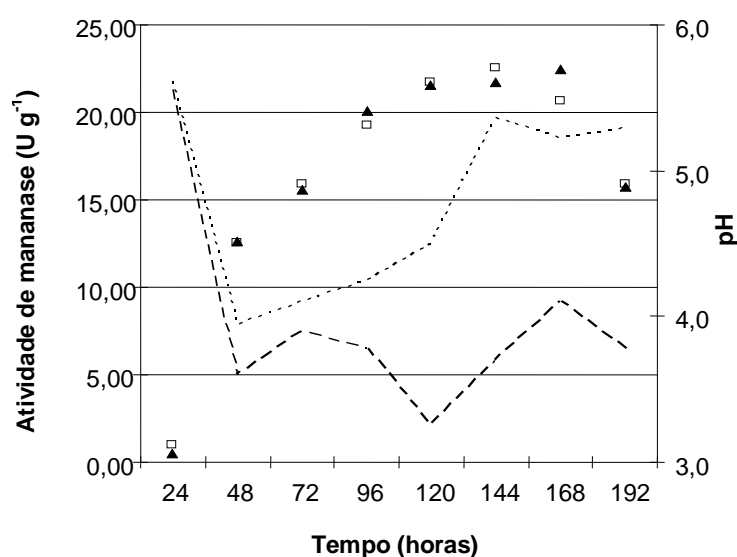
também não ocorreram até aqui e podem contribuir para um aumento significativo da atividade enzimática.

### 3.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MANANASE

As linhagens LPB-28 e NRRL-599 de *A. niger* foram testadas em estudo da cinética de produção de mananase por FES utilizando casca de soja como substrato/suporte.

*A. niger* LPB-28 produziu praticamente a mesma atividade mananolítica ( $22,55 \text{ U g}^{-1}$ ) do que a cepa NRRL-599 ( $22,45 \text{ U g}^{-1}$ ), porém, com tempo reduzido em 24 horas (144 contra 168 horas), ou seja, com uma maior produtividade. Portanto, a cepa LPB-28 foi escolhida como a melhor cepa produtora de mananase no suporte casca de soja por FES (Figura 3).

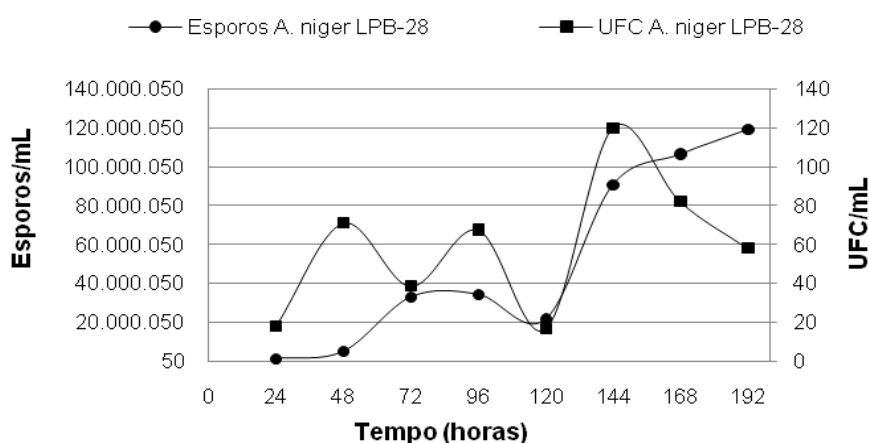
O pH do meio fermentado por ambas as linhagens apresentou o mesmo perfil, mantendo-se sempre ácido: no início do processo fermentativo o pH estava em torno de 5,5 e caiu ao longo do processo subindo novamente (para 5,3 e 4,1 para LPB-28 e NRRL-599, respectivamente) onde a mananase apresentou suas melhores atividades. A atividade mananolítica, produzida por estas linhagens, é mais alta em pHs mais ácidos mostrando a possibilidade do emprego desta enzima em processos cujas condições são ácidas.



**Fig.3.** Estudo cinético da produção de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) por *A. niger* LPB-28 ( $\square$ ) e NRRL-599 ( $\blacktriangle$ ), em FES com casca de soja e solução nutritiva. O pH foi mensurado ao longo do processo: ..... para *A. niger* LPB-28, e ---- para *A. niger* NRRL-599

### 3.5 VIABILIDADE CELULAR

Um estudo cinético da viabilidade celular foi realizado a fim de se determinar o tempo onde ocorre a maior viabilidade celular da cepa LPB-28. Na Figura 4 é possível observar a crescente produção de esporos ao longo do tempo entretanto, a melhor viabilidade é compreendida em 144 horas onde estes esporos dão origem a 120 UFCs/mL, a maior contagem de UFCs observada no estudo.



**Fig.4.** Estudo da viabilidade de *A. niger* LPB-28

A produção de esporos para os fungos filamentosos além de ser uma das formas de reprodução, é também uma resposta à situação de “stress” a qual o microrganismo está inserido. Neste caso, essa situação é representada pelo meio de cultura pobre em nutrientes: apenas 2% de galactomanana.

Anteriormente à realização deste procedimento, a interrupção do crescimento do inóculo ocorria em 168 horas. Com o estudo de viabilidade da cepa *A. niger* LPB-28 este tempo foi reduzido para 144 horas, o que gera considerável economia de custos, principalmente num processo em larga escala já que foi obtida uma redução de 24 horas na obtenção do inóculo.



### 3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA SE SOJA

Na Tabela 3 estão presentes as características do suporte escolhido, a casca de soja.

Segundo Couto e Sanromán (2005), o processo de FES é certamente uma boa forma de utilizar resíduos sólidos ricos em nutrientes como suporte e, desde que os resíduos agro-industriais, produzidos em grandes quantidades, forem ricos em carboidratos e outros nutrientes, podem também ser empregados como substrato para a produção de enzimas e diversos outros bioprodutos, o que é o caso da casca de soja que apresentou elevado teor de açúcares totais (74,3 g/L), além de percentual de fibra bruta de 65% e pH naturalmente ácido (5,5), o que propicia o crescimento do fungo, além da produção enzimática (mananase).

**Tabela 3.** Composição química da casca de soja

Umidade (%)	Açúcares totais (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Fibra bruta (%)	Cinzas (%)	Proteínas totais (%)	pH
10,4	74,3	2,8	65	4,1	13,3	5,5

## 4 CONCLUSÕES

As linhagens de fungos filamentosos *Aspergillus niger*, mostraram-se mais aptas à produção de mananase, do que as outras cepas microbianas estudadas (*Trichoderma* sp. e *Streptomyces* sp.).

A adição de LBG 2% na composição da solução nutritiva não se mostrou necessária, o que é um fator positivo, pois indica que o próprio suporte escolhido, possui também a função de substrato na produção da mananase.

A casca de soja não requer pré-tratamento como a casca de café, sendo realizada a escolha de 100% deste resíduo para compor o suporte/substrato da FES, uma vez que os melhores resultados para produção de mananase foram obtidos nesta porcentagem e também com 75%, sem adição de LBG 2%.

*A. niger* LPB-28 foi a melhor cepa para produção de mananase (22,55 U g<sup>-1</sup>) por fermentação no estado sólido.

O período total de 144 horas foi considerado o mais adequado para interromper o crescimento do inóculo e o processo fermentativo para obtenção da mananase.

A caracterização da casca de soja mostrou que este resíduo possui a composição ideal para o crescimento de *A. niger* e produção da enzima de interesse, a mananase.

## CAPÍTULO II

### OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE MANANASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger* EM FRASCOS DE ERLENMEYER

#### RESUMO

O processo de produção de qualquer bioproduto, para se tornar economicamente viável e principalmente rentável, precisa ser otimizado. Sendo assim, diversos fatores que podem interferir sobre a obtenção do produto devem ser estudados. O produto desse estudo foi a enzima mananase, responsável pela hidrólise de mananas encontradas em diversas etapas de processos industriais que utilizam alguma fonte vegetal para a obtenção de vários produtos para uso humano e animal. Para produzir a mananase, empregou-se a técnica de fermentação no estado sólido (FES) utilizando um abundante resíduo da agroindústria brasileira, a casca de soja e um fungo filamentoso denominado *Aspergillus niger* LPB-28. Para otimizar a produção de mananase com estas características, foi utilizada a ferramenta estatística de planejamentos experimentais e o programa computacional Statistica 5.0, onde foram avaliadas condições de extração da enzima (tipo e volume de solução extratora, tempo de homogeneização), variáveis físico-químicas (pH e teor de umidade iniciais) do processo fermentativo, e composição da solução nutritiva utilizada. Os melhores rendimentos de mananase (média de  $179 \text{ U g}^{-1}$ ) foram obtidos utilizando teor de umidade inicial do meio fermentativo em 70% sem ajuste do pH inicial, e solução nutritiva composta por  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0 g/L) e uréia (0,7 g/L). A melhor condição para extração da enzima foi estabelecida utilizando solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 na proporção 1:10 sob 20 minutos de agitação.

Palavras-chave: Mananase, Fermentação no estado sólido, Otimização, Planejamento experimental.

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme Rodrigues e Iemma (2005), quando se visa a obtenção de um bioproduto, o planejamento experimental baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas do processo, ou simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas.

Para se atingir esses objetivos, várias estratégias podem ser utilizadas, desde delineamentos fatoriais fracionados ou os de Plackett & Burman, excelentes para uma avaliação prévia e seleção dos diversos níveis das variáveis, até o delineamento composto central rotacional (DCCR), quando tais variáveis são definidas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A produção de enzimas (mananases, celulasas, xilanases, galactosidases, amilases, fitases, etc.) é realizada por ambos os processos de fermentação, sólido e submerso, empregando diversas espécies microbianas, principalmente bactérias e fungos. Entretanto, para o processo de FES há preferência pelas espécies fúngicas devido à reprodutibilidade muito próxima do habitat natural destes microrganismos, o qual essa técnica de fermentação é capaz de proporcionar (Singh et al., 2008).

A otimização da produção de mananase por *A. niger* LPB-28, utilizando a técnica de FES com casca de soja como suporte/substrato foi o principal objetivo deste segundo Capítulo. Realizada em diferentes etapas, utilizando estratégias de planejamento experimental e análise estatística, foram avaliadas condições de extração da mananase, as condições físico-químicas do processo de produção da enzima e, posteriormente, a composição da solução nutritiva adicionada ao suporte/substrato.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* LPB-28, cultivado e selecionado de acordo com estudo anterior (Capítulo I).

## 2.2 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado de acordo com o sub-item 2.5 do Capítulo I, com redução do tempo de incubação a 28 °C para 144 horas.

## 2.3 SUPORTE/SUBSTRATO

Cascas de soja (cedidas pela Imcopa<sup>®</sup>) foram utilizadas como suporte/substrato para a FES. As cascas foram peneiradas manualmente para obtenção de tamanho da partícula intermediária, compreendido entre 0,8 e 2,0 mm.

## 2.4 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

O processo fermentativo - realizado em duplicata quando na ausência de planejamento experimental - foi conduzido em frascos de Erlenmeyer (125 mL) com 5 g de casca de soja, à qual foi adicionada solução nutritiva conforme Puchart et al. (2004) e descrição no sub-item 2.3 do Capítulo I, além de inóculo na taxa de  $1 \times 10^7$  esporos/g de casca de soja. Os frascos foram incubados a 28 °C durante 144 horas.

A solução nutritiva juntamente com o inóculo (preparado conforme o sub-item 2.5 do Capítulo I) foram utilizados para o ajuste da umidade inicial e enriquecimento do suporte/substrato. A umidade inicial foi ajustada primeiramente em 75% e, posteriormente, conforme as etapas de otimização.

## 2.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA MANANASE

Nesta etapa do trabalho, foi selecionada a solução de extração. Em seguida, determinou-se o volume de solução e o tempo de homogeneização.

Para extração da mananase, 5 g de fermentado foram homogeneizados em agitador magnético por 10 minutos, com 50 mL das seguintes soluções extratoras: água destilada, soluções tampão fosfato de sódio 50 mM pHs 5,5 e 6,0; e tampões citrato e acetato de sódio 50 mM pHs 5,0, 5,5 e 6,0. A mistura foi filtrada em papel

TNT e centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1, e submetido à determinação da atividade enzimática.

A Tabela 1 mostra as condições estudadas para extração da enzima. Foram estudados o tempo de agitação (5, 10 e 15 minutos), e o volume (30, 40 e 50 mL) de solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, em diferentes níveis. Neste estudo foi empregado um planejamento experimental fatorial completo ( $3^{2-0}$ ) com três repetições do ponto central.

**Tabela 1.** Níveis das variáveis estudadas na otimização da extração da mananase

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Volume de tampão (mL)	<b>V</b>	30	40	50
Tempo de agitação (min)	<b>t</b>	5	10	15

## 2.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

A otimização das condições de umidade e pH para a produção de mananase foi conduzida com o auxílio de um planejamento experimental do tipo fatorial completo ( $3^{2-0}$ ) com três repetições do ponto central.

Na Tabela 2 estão listadas as variáveis do processo fermentativo, estudadas em seus diferentes níveis: teores de umidade inicial (65, 70, e 75%) e pH (4,5, 5,0 e 5,5, ajustados com NaOH 1M e HCl 1M).

**Tabela 2.** Níveis das variáveis estudadas na otimização das condições físico-químicas de produção de mananase por FES

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
pH inicial	<b>pH</b>	4,5	5	5,5
Umidade inicial (%)	<b>%</b>	65	70	75

As condições do processo fermentativo, com exceção da umidade e pH que são objeto desta etapa do estudo foram definidas de acordo com o sub-item 2.4.

## 2.7 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

Nesta etapa de otimização, a umidade inicial foi ajustada para 70%.

### 2.7.1 Fonte de nitrogênio

A influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de mananase por FES foi analisada. O estudo foi realizado em duplicata utilizando-se as seguintes fontes de nitrogênio (g/L): sulfato de amônio (7,62), uréia (3,4), cloreto de amônio (6,2), e a mistura de uréia (1,07) e extrato de levedura (14,3), cloreto de amônio (1,94) e extrato de levedura (14,3). Tais fontes foram escolhidas de acordo com o teor de nitrogênio presente na solução nutritiva composta por extrato de leveduras (14,3) e sulfato de amônio (2,1), a qual foi denominada padrão, sendo também avaliada.

### 2.7.2 Seleção de componentes significativos da solução nutritiva

A influência de alguns componentes químicos da solução nutritiva foi estudada. Um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios (8 variáveis analisadas em 3 níveis), foi empregado na etapa de seleção das variáveis (componentes) mais significativas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Níveis das variáveis estudadas na seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Variáveis independentes (g/L)	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Sulfato de magnésio	<b>Mg</b>	0	1,5	3,0
Sulfato férrico	<b>Fe</b>	0	0,25	0,5
Fosfato de potássio	<b>Kp</b>	0	5,0	10,0
Sulfato de zinco	<b>Zn</b>	0	0,5	1,0
Sulfato de manganês	<b>Mn</b>	0	0,25	0,5
Cloreto de cobalto	<b>Co</b>	0	0,1	0,2
Cloreto de potássio	<b>Kc</b>	0	0,3	0,6
Sulfato de cobre	<b>Cu</b>	0	0,05	0,1

### 2.7.3 Segunda etapa de otimização da composição da solução nutritiva

Os componentes mais significativos sobre a produção de mananase (sulfato de manganês e cloreto de cobalto), observados no estudo anterior, foram avaliados, todos em diferentes concentrações, na presença de uréia (fonte de nitrogênio) (Tabela 4). Para tanto, empregou-se um planejamento experimental do tipo fatorial incompleto ( $3^{3-1}$ ) com 4 repetições do ponto central.

**Tabela 4.** Níveis das variáveis estudadas na segunda etapa de seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Variáveis independentes (g/L)	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Sulfato de manganês	<b>Mn</b>	0,5	0,7	0,9
Cloreto de cobalto	<b>Co</b>	0,2	0,4	0,6
Uréia	<b>Ur</b>	1,0	3,4	6,0

### 2.7.4 Terceira etapa de otimização da composição da solução nutritiva

Na etapa anterior, o cloreto de cobalto não foi significativo, tendo sido eliminado da composição da solução nutritiva. Sendo assim, estudou-se nesta etapa a influência das concentrações de uréia (concentrações menores) e sulfato de manganês (concentrações maiores), apresentadas na Tabela 5. Neste caso, empregou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^2$  incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições do ponto central.

**Tabela 5.** Níveis das variáveis estudadas na terceira etapa de seleção dos componentes da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Variáveis independentes (g/L)	Símbolo	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Uréia	<b>Ur</b>	0,28	0,4	0,7	1,0	1,12
Sulfato de manganês	<b>Mn</b>	0,86	0,9	1,0	1,1	1,14



## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos planejamentos experimentais foram analisados pelo programa computacional Statística 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

## 2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para determinar a atividade enzimática foram feitas análises em triplicata de acordo com o sub-item 2.8 do Capítulo I, utilizando filtrado enzimático diluído em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 na proporção 1:10. Os resultados da atividade mananolítica foram expressos em U g<sup>-1</sup> de matéria seca.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos têm sido realizados para produção de  $\beta$ -mananase por via microbiana e, num primeiro momento, os estudo de otimização limitam-se ao meio de cultura e às condições do processo, em escala laboratorial.

Informações a respeito da otimização da produção de mananase por FES são escassas, e geralmente, não utilizam as mesmas condições aqui testadas, inviabilizando a comparação de resultados das atividades mananolíticas. Entretanto, a obtenção crescente dessas condições ótimas é indispensável para o escalonamento da produção de  $\beta$ -mananase e conseqüente produção em escala industrial, utilizando o processo de fermentação no estado sólido.

### 3.1 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA MANANASE

Os resultados das atividades de mananase obtidas com diferentes soluções de extração estão apresentados na Tabela 6.

A extração com água destilada apresentou os melhores resultados de atividade mananolítica (85,0 U g<sup>-1</sup>). Porém, como o pH da água é variável, decidiu-se utilizar, a partir deste estudo, a solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, como

uma solução padrão de extração, o qual apresentou o segundo melhor resultado ( $73,5 \text{ U g}^{-1}$ ). O pH 5,0 seria comprovado posteriormente, em estudo de caracterização da enzima, como o melhor para a atividade mananolítica.

**Tabela 6.** Atividade média de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ ) extraída do meio fermentativo com diferentes soluções

<b>Sol. extratora</b>	<b>pH</b>	<b>5,0</b>	<b>5,5</b>	<b>6,0</b>	<b>-</b>
Água destilada		-	-	-	85,0
Tampão fosfato de sódio		-	68,5	70,3	-
Tampão citrato de sódio		73,5	55,5	67,3	-
Tampão acetato de sódio		53,4	50,3	56,3	-

O estudo para verificação da melhor solução extratora foi realizado devido a inexistência de uma solução específica para extração de enzimas, uma vez que vários autores (Techapun et al., 2001; Heck et al., 2005; Jiang et al., 2006; Okafor et al., 2007; Foong et al., 2009;) utilizam as diferentes soluções em diferentes pH, como as aqui testadas, para extração de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Ressalta-se que, para extração das enzimas, a molaridade das soluções tampões utilizadas por esses autores, é quase na sua totalidade, de 50 mM com pH ácido, variando de 4,0 a 6,0.

No estudo das condições mais adequadas para extração da mananase, o melhor rendimento ( $52,83 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtido quando utilizados os níveis máximos testados de volume de solução tampão (50 mL) e tempo de homogeneização (15 minutos) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultados do planejamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$ , com três repetições do ponto central, para estudo das condições de extração da mananase

<b>Experimento</b>	<b>Níveis</b>		<b>Atividade de mananase (<math>\text{U g}^{-1}</math>)</b>
	<b>V</b>	<b>t</b>	
1	30	5	35,27
2	30	10	44,15
3	30	15	47,83
4	40	5	37,12
5	40	10	49,98
6	40	15	34,33
7	50	5	30,23
8	50	10	42,98
9	50	15	52,83
10	40	10	45,16
11	40	10	52,16

Segundo Yano et al. (1991) o meio fermentado deve ser impregnado durante um tempo suficiente, numa adequada quantidade de uma apropriada solução ou solvente extrator para total recuperação do produto de interesse. A otimização das condições extratoras é uma maneira simples de obter seletivamente a biomolécula de interesse a partir do meio fermentativo sólido (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES 2000).

No diagrama de Pareto (Figura 1), pode-se observar que nenhuma das variáveis foi significativa, o que pode ser confirmado também pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8, onde nem o volume da solução extratora ou tempo de homogeneização do fermentado, analisados linearmente (L) ou de forma quadrática (Q), foram significativos já que os valores de p foram todos superiores a 0,05.

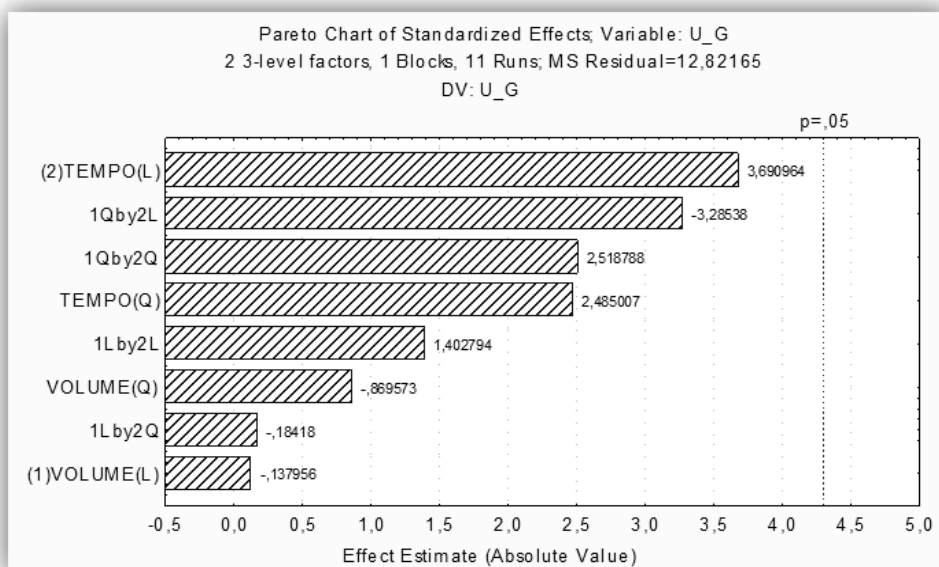


Fig.1. Diagrama de Pareto para o estudo das condições de extração da mananase

Tabela 8. ANOVA da otimização das condições de extração da mananase

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1)VOLUME (L)	0,244	1	0,24402	0,019032	0,903
VOLUME (Q)	9,6952	1	9,695175	0,756157	0,476
(2)TEMPO (L)	174,67	1	174,6721	13,62322	0,066
TEMPO (Q)	79,177	1	79,177	6,17526	0,131
1L com 2L	25,231	1	25,23083	1,967831	0,296
1L com 2Q	0,4349	1	0,434939	0,033922	0,871
1Q com 2L	138,39	1	138,3937	10,79375	0,081
1Q com 2Q	81,344	1	81,34431	6,344295	0,128

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

A partir deste estudo, portanto, a extração da enzima foi realizada utilizando 50 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, ou ainda, a proporção 1:10 de fermentado e solução tampão, respectivamente.

Com respeito ao tempo utilizado na agitação, foi estabelecido 20 minutos, uma vez que o gráfico de Pareto mostrou uma tendência a maiores rendimentos de mananase com maiores tempos de homogeneização. A significância estatística da equação foi checada e a determinação do coeficiente ( $R^2$ ) foi calculado em 0,95, indicando que 95% da variabilidade de resposta pode ser explicada pelo modelo adotado.

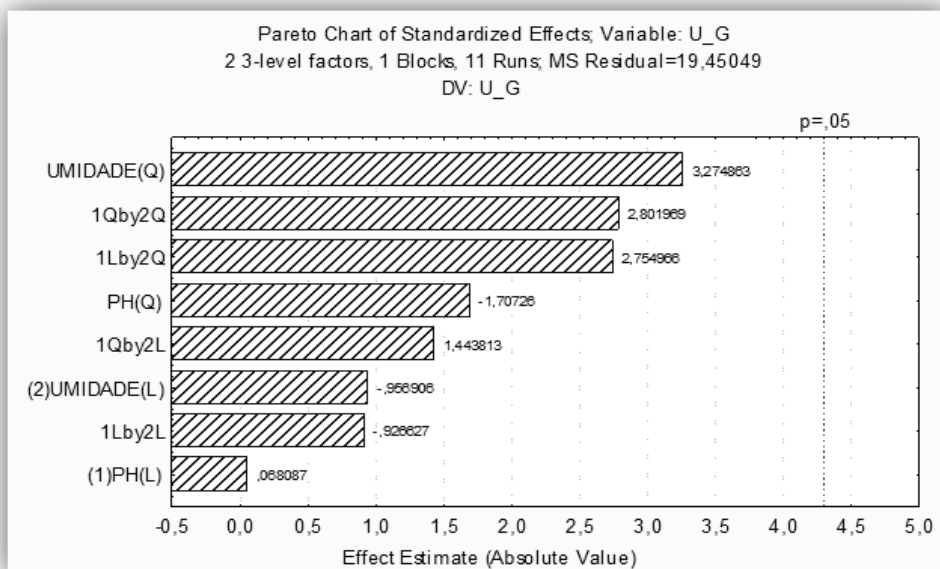
### 3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

Os resultados do planejamento experimental estão dispostos na Tabela 9, onde a maior atividade de mananase ( $78,45 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtida com o pH inicial 5,0 e a umidade inicial de 70%. Valores de pH próximos a este, foram observados também nas amostras após a fermentação em estudos de cinética de produção, realizados anteriormente (Capítulo I). Portanto, definiu-se como desnecessário o ajuste do pH inicial do meio fermentativo uma vez, que a própria composição do meio era capaz de fornecer o pH ideal para a produção da enzima. Resultados satisfatórios de atividade mananolítica ( $75,16 \text{ U g}^{-1}$ ) também foram obtidos com a umidade inicial de 70% e com pH de 5,5. Tal fato demonstra que a faixa de pH 5,0 – 5,5 pode ser utilizada na produção de mananase.

**Tabela 9.** Resultados do planejamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$  com três repetições do ponto central, para estudo de umidade e pH inicial do processo de FES para produção de mananase

Experimento	Níveis		Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ )
	pH	%	
1	4,5	65	68,69
2	4,5	70	60,89
3	4,5	75	65,65
4	5,0	65	51,73
5	5,0	70	70,03
6	5,0	75	55,64
7	5,5	65	66,00
8	5,5	70	75,16
9	5,5	75	54,79
10	5,0	70	71,96
11	5,0	70	78,45

Neste estudo, nenhum dos fatores estudados (pH e umidade inicial) foi significativo em  $p \leq 0,05$ , como pode ser observado na Figura 2 e na ANOVA apresentada na Tabela 10. Os fatores analisados linear ou quadraticamente foram todos superiores a 0,05. O  $R^2$  obtido neste estudo foi de 0,94.



**Fig.2.** Diagrama de Pareto para o estudo de otimização do pH e umidade inicial do processo de FES para produção de mananase

**Tabela 10.** ANOVA da otimização das condições de pH e umidade inicial do processo de FES para produção de mananase

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
pH (L)	0,090169	1	0,090169	0,004636	0,951911
pH (Q)	56,69316	1	56,69316	2,914742	0,229895
(2)UMIDADE (L)	17,81022	1	17,81022	0,915669	0,439597
UMIDADE (Q)	208,6012	1	208,6012	10,72473	0,081945
1L com 2L	16,70092	1	16,70092	0,858637	0,451944
1L com 2Q	147,626	1	147,626	7,589835	0,110368
1Q com 2L	40,54639	1	40,54639	2,084595	0,285608
1Q com 2Q	152,7064	1	152,7064	7,851032	0,107265

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

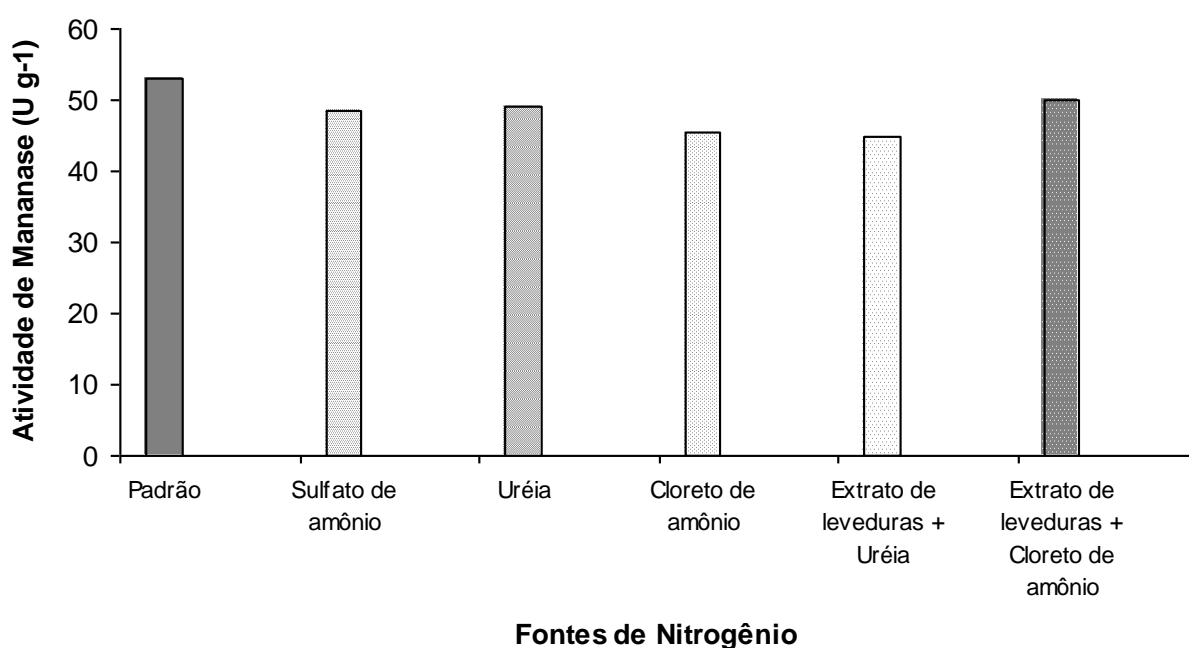
### 3.3 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES

#### 3.3.1 Seleção da fonte de nitrogênio

A Figura 3 apresenta as diferentes fontes de nitrogênio testadas: sulfato de amônio, uréia, cloreto de amônio, e a mistura de uréia com extrato de leveduras, e cloreto de amônio com extrato de leveduras, além do padrão composto por extrato de leveduras com sulfato de amônio, e sua influência sobre a produção de mananase.

A fonte de nitrogênio padrão: extrato de leveduras (14,3 g/L) com sulfato de amônio (2,1 g/L), propiciou uma maior atividade enzimática ( $53 \text{ U g}^{-1}$ ). No entanto, outras fontes de nitrogênio poderiam ser utilizadas igualmente a exemplo da uréia ( $49 \text{ U g}^{-1}$ ) e da mistura extrato de levedura com cloreto de amônio ( $50 \text{ U g}^{-1}$ ).

Ambas tiveram um efeito positivo sobre a produção de mananase. Contudo, ao analisarmos o custo do meio, seria interessante a substituição do extrato de leveduras por uma fonte de nitrogênio mais viável economicamente, tal qual a uréia. Por esta razão, a uréia foi selecionada como fonte de nitrogênio para as etapas seguintes de otimização.



**Fig. 3.** Efeito das fontes de nitrogênio da solução nutritiva para produção de mananase

### 3.3.2 Seleção de componentes significativos da solução nutritiva

Para avaliar a composição da solução nutritiva, os sais mais comumente relatados (SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999; Puchart et al., 1999, 2004; ACHARYA; ACHARYA; MODI, 2008; Okafor et al., 2007; MAGALHÃES; MILAGRES, 2009) para a produção de mananase foram testados. Três níveis foram estudados sendo a ausência, uma concentração intermediária e uma concentração máxima (descrita na literatura).

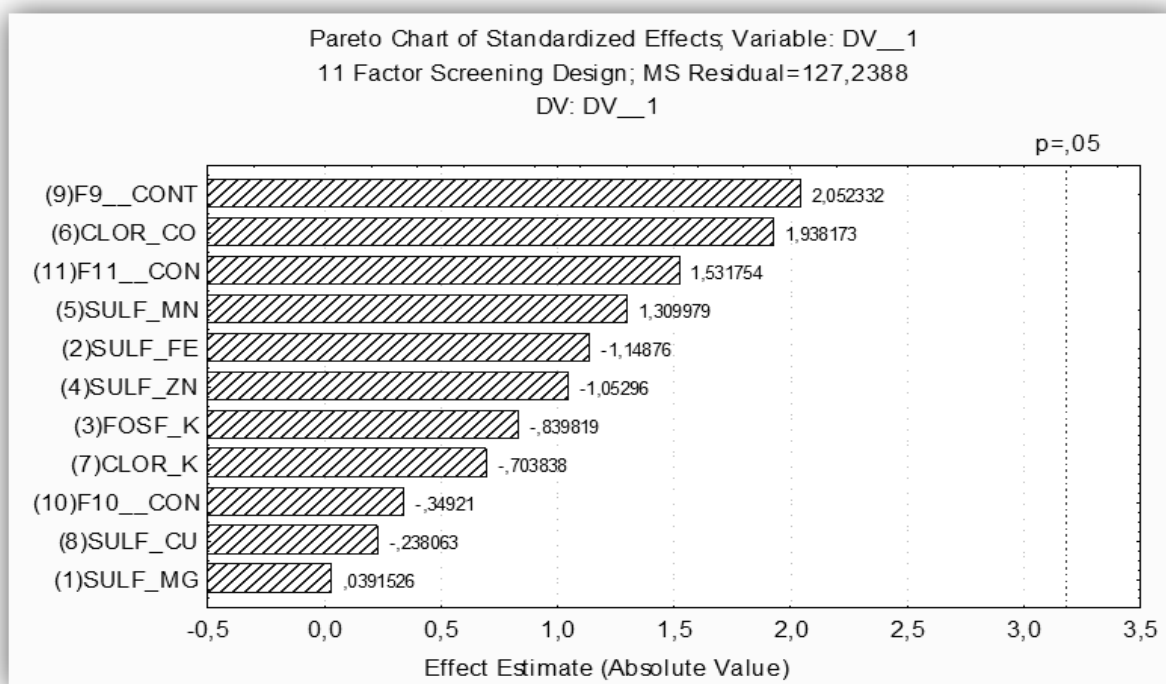
As melhores atividades mananolíticas foram obtidas com as concentrações relatadas na literatura de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0 g/L),  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g/L) atingindo  $160,65 \text{ U g}^{-1}$ , e KCl (0,6 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3,0 g/L) com  $152,48 \text{ U g}^{-1}$  de atividade. As concentrações intermediárias a estas, de todos os sais componentes testados, produziram resultados significativos ( $149,66$  e  $144,02 \text{ U g}^{-1}$ ), apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados do planejamento experimental Placket-Burmann para otimização dos sais minerais (g/L) na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Experimento	Níveis								Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ )
	Mg	I	Kp	Zn	Mn	Co	Kc	Cu	
1	3,0	0	10,0	0	0	0	0,6	0,1	136,56
2	3,0	0,5	0	1,0	0	0	0	0,1	120,02
3	0	0,5	10,0	0	0,5	0	0	0	141,21
4	3,0	0	10,0	1,0	0	0,2	0	0	132,82
5	3,0	0,5	0	1,0	0,5	0	0,6	0	124,40
6	3,0	0,5	10,0	0	0,5	0,2	0	0,1	131,47
7	0	0,5	10,0	1,0	0	0,2	0,6	0	126,16
8	0	0	10,0	1,0	0,5	0	0,6	0,1	112,36
9	0	0	0	1,0	0,5	0,2	0	0,1	160,65
10	3,0	0	0	0	0,5	0,2	0,6	0	152,48
11	0	0,5	0	0	0	0,2	0,6	0,1	131,27
12	0	0	0	0	0	0	0	0	124,56
13	1,5	0,25	5,0	0,5	0,25	0,1	0,3	0,05	149,66
14	1,5	0,25	5,0	0,5	0,25	0,1	0,3	0,05	129,22
15	1,5	0,25	5,0	0,5	0,25	0,1	0,3	0,05	144,02

Como mostra o diagrama de Pareto (Figura 4), nenhum dos sais minerais foi significativo. O cloreto de cobalto e sulfato de manganês foram os componentes mais importantes, sendo que o diagrama de Pareto sugere que maiores concentrações destes dois sais seriam mais eficientes na produção de mananase. A ANOVA (Tabela 12) por sua vez, confirma a insignificância dos sais, nas

concentrações estudadas, para produção de mananase, já que todos os valores de p foram superiores a 0,05 ( $R^2 = 0,84$ ).



**Fig.4.** Diagrama de Pareto para a otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES

**Tabela 12.** ANOVA da otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1)SULF_MG	0,195048	1	0,195048	0,001533	0,971228
(2)SULF_FE	167,9108	1	167,9108	1,319651	0,333941
(3)FOSF_K	89,74104	1	89,74104	0,705296	0,462664
(4)SULF_ZN	141,0727	1	141,0727	1,108724	0,369678
(5)SULF_MN	218,3474	1	218,3474	1,716044	0,281483
(6)CLOR_CO	477,9746	1	477,9746	3,756516	0,147976
(7)CLOR_K	63,03261	1	63,03261	0,495388	0,532245
(8)SULF_CU	7,211156	1	7,211156	0,056674	0,827166

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

### 3.3.3 Segunda etapa de otimização da composição da solução nutritiva

Como o sulfato de manganês e cloreto de cobalto foram os componentes da solução nutritiva que mais se destacaram no estudo anterior, mesmo que as concentrações estudadas não tenham se mostrado significantes para a produção de



mananase, um segundo estudo utilizando concentrações maiores destes sais foi realizado.

A concentração de uréia foi novamente analisada, utilizando o valor testado no estudo das fontes de nitrogênio, como nível intermediário.

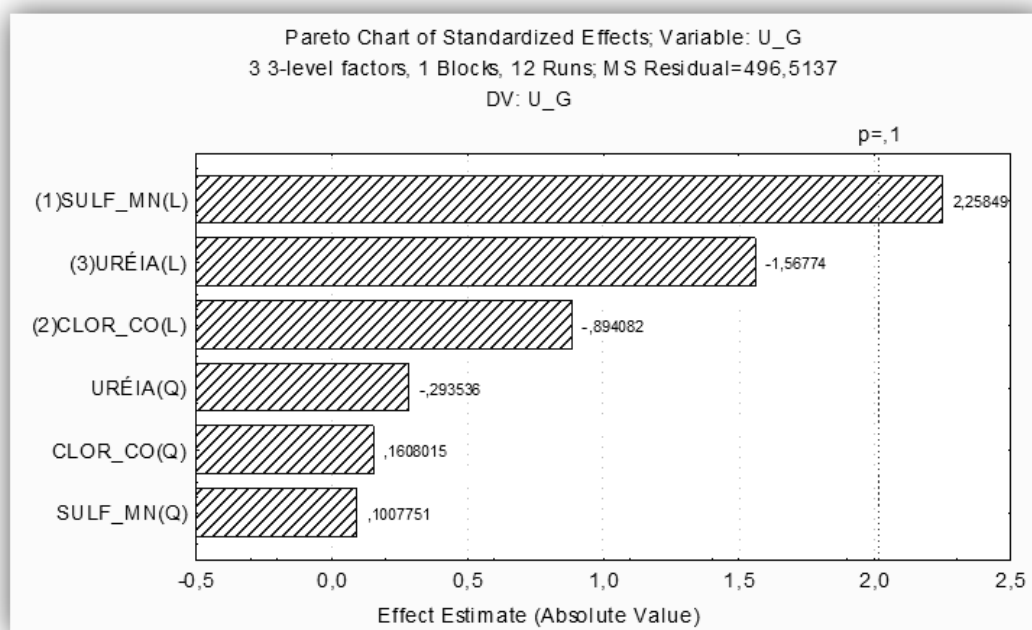
Um considerável aumento na atividade mananolítica pôde ser observado quando utilizadas maiores concentrações de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,9 g/L) e menores e intermediárias concentrações de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,2 e 0,4 g/L) e uréia (1,0 e 3,4 g/L), atingindo-se atividade máxima (até este momento) de mananase:  $199,42 \text{ U g}^{-1}$ . Estes resultados são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resultados do planejamento fatorial incompleto  $3^{(3-1)}$  com 4 repetições do ponto central, para as várias concentrações (g/L) de sulfato de manganês, cloreto de cobalto e uréia como composição da solução nutritiva para produção de mananase

Experimento	Níveis			Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ )
	Mn	Co	Ur	
1	0,5	0,2	1,0	159,28
2	0,5	0,4	6,0	126,87
3	0,5	0,6	3,4	129,53
4	0,7	0,2	6,0	157,64
5	0,7	0,4	3,4	175,27
6	0,7	0,6	1,0	166,96
7	0,9	0,2	3,4	183,95
8	0,9	0,4	1,0	199,42
9	0,9	0,6	6,0	155,58
10	0,7	0,4	3,4	175,28
11	0,7	0,4	3,4	168,12
12	0,7	0,4	3,4	116,14

O coeficiente de regressão ( $R^2$ ) obtido neste estudo foi 0,62, ou seja, ruim pois, pouco mais da metade dos resultados obtidos (62%), pode ser explicado pelo modelo experimental adotado.

Ao se analisar o diagrama de Pareto (Figura 5), é possível observar que *A. niger* LPB-28 prefere elevada concentração de sulfato de manganês e menor concentração de uréia, para produção de mananase nas condições testadas ( $p \leq 0,1$ ).



**Fig.5.** Diagrama de Pareto e parâmetros significativos ( $p \leq 0,1$ ) no estudo das concentrações (g/L) de sulfato de manganês, cloreto de cobalto e uréia para produção de mananase por FES

A ANOVA apresentada na Tabela 14 confirma que apenas o sulfato de manganês foi significativo para  $p \leq 0,1$ , com razão  $p = 0,07$ .

**Tabela 14.** ANOVA da otimização dos sais minerais na composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1)SULF_Mn (L)	2532,605	1	2532,605	5,100777	0,073491
SULF_Mn (Q)	5,042405	1	5,042405	0,010156	0,923645
(2)CLOR_Co (L)	396,9047	1	396,9047	0,799383	0,412243
CLOR_Co (Q)	12,83842	1	12,83842	0,025857	0,878545
(3)URÉIA (L)	1220,338	1	1220,338	2,457814	0,177727
URÉIA (Q)	42,78122	1	42,78122	0,086163	0,780906

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (10%)

### 3.3.4 Terceira etapa de otimização da composição da solução nutritiva

Como apresentado no estudo anterior, o cloreto de cobalto nos níveis estudados não foi significativo e, portanto, excluído nesta terceira e última etapa de otimização da solução nutritiva para produção de mananase por FES.

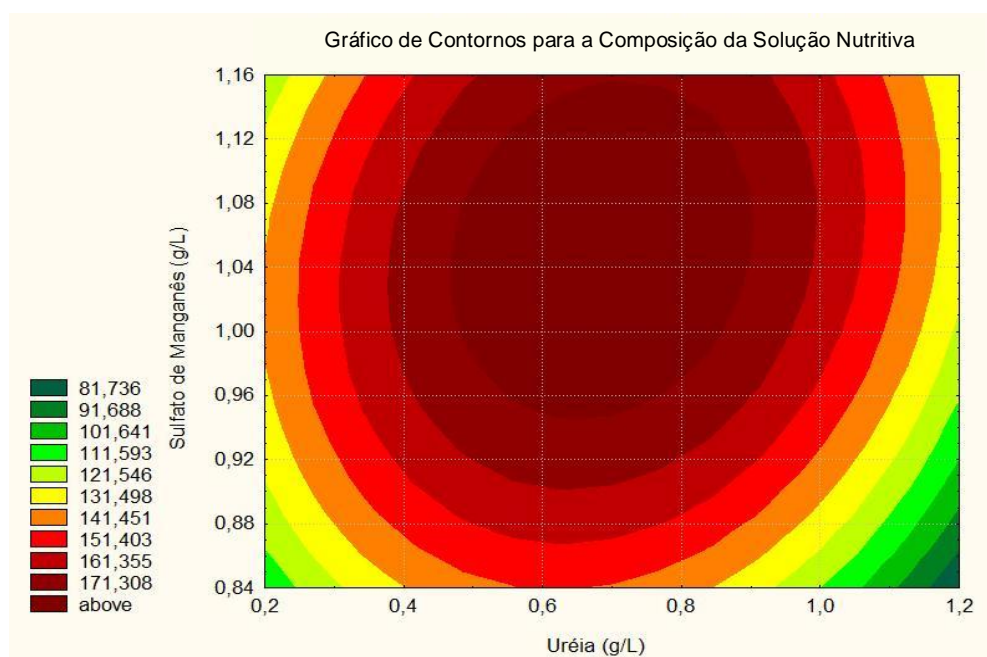
Os resultados obtidos neste último estudo podem ser visualizados na Tabela 15, onde se observa claramente, melhores produções de mananase com

concentrações intermediárias de sulfato de manganês (1,0 g/L) e uréia (0,7 g/L) e média de atividade da enzima em 178,95 U g<sup>-1</sup>.

**Tabela 15.** Resultados do delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> com 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições do ponto central, das concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia como composição da solução nutritiva para produção de mananase por FES

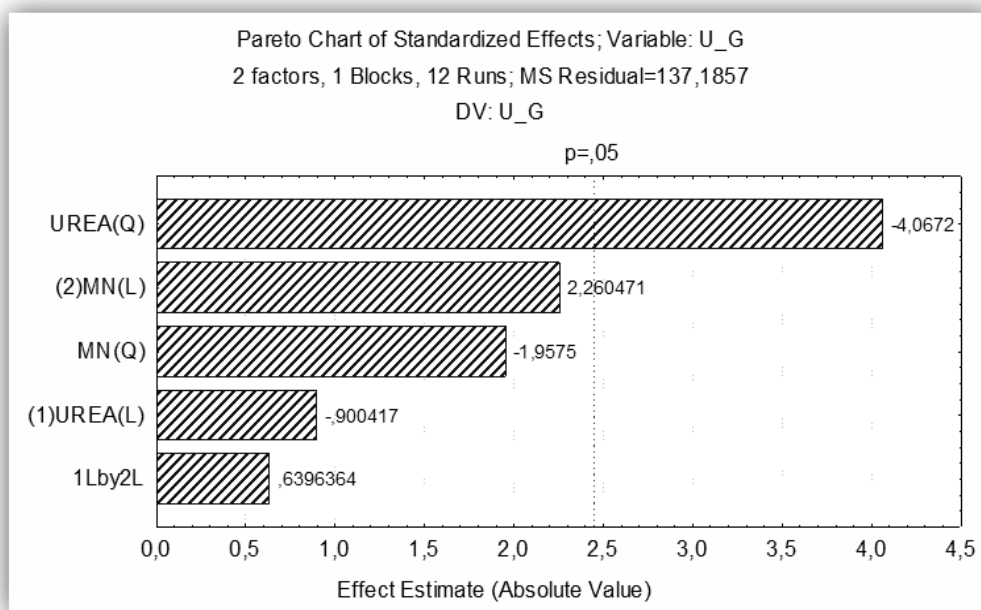
Experimento	Níveis		Atividade de mananase (U g <sup>-1</sup> )
	Ur	Mn	
1	0,4	0,9	158,64
2	0,4	1,1	153,14
3	1,0	0,9	150,23
4	1,0	1,1	159,71
5	0,28	1,0	146,82
6	1,12	1,0	127,03
7	0,7	0,86	131,39
8	0,7	1,14	181,53
9	0,7	1,0	176,19
10	0,7	1,0	180,23
11	0,7	1,0	182,41
12	0,7	1,0	177,00

Este planejamento experimental gerou um  $R^2 = 0,8$ , e possibilitou a criação de um gráfico de contornos (Figura 6), onde é possível observar que as concentrações intermediárias de sulfato de manganês (1,0 g/L) e uréia (0,7 g/L), são as ideais para compor a solução nutritiva que auxiliará a obtenção do teor de umidade inicial e maior produção de mananase por *A. niger* LPB-28 em processo de FES.



**Fig.6.** Gráfico de Contornos para as concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia, que compõem a solução nutritiva para produção de mananase por FES.

O gráfico de Pareto (Figura 7) mostra que a uréia (Q) foi significativa e indica que a redução de sua concentração pode ser mais eficiente na produção de mananase. A ANOVA (Tabela 16) confirma este fator analisado quadraticamente como sendo o único significativo já que sua razão p foi a única menor que 0,05.



**Fig.7.** Gráfico de Pareto mostrando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) nas concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia para produção de mananase por FES

**Tabela 16.** ANOVA das concentrações (g/L) de sulfato de manganês e uréia como compostos da solução nutritiva para produção de mananase por FES

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1)URÉIA (L)	111,2233	1	111,2233	0,81075	0,402591
URÉIA (Q)	2269,337	1	2269,337	16,54209	0,006597
(2)Mn (L)	700,9818	1	700,9818	5,109731	0,064506
Mn (Q)	525,6709	1	525,6709	3,831821	0,098034
1L com 2L	56,12741	1	56,12741	0,409135	0,546041

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

## 4 CONCLUSÕES

Todas as soluções testadas para extração da mananase foram eficientes, entretanto, a solução tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 foi a escolhida para dar continuidade ao estudo, devido ao fato de seu pH ser mais estável que da água destilada e a atividade mananolítica ter sido a melhor dentre todas as outras obtidas com as diferentes soluções tampão testadas.

O volume da solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 ficou estabelecido em 50 mL com tempo de homogeneização da mistura fermentado e solução tampão em 20 minutos.

Para as condições físico-químicas, os melhores rendimentos de mananase foram obtidos quando utilizados pHs na faixa entre 5,0 e 5,5 e a umidade inicial em 70%. Esses resultados já eram parcialmente esperados, pois sabe-se que as fermentações no estado sólido costumam ter seu melhor desempenho na faixa de umidade entre 65 e 75%.

Devido aos melhores pHs do meio fermentativo serem os mesmos apresentados para a casca de soja (Capítulo I), dispensou-se o ajuste deste fator. Tal resultado, juntamente com a redução da quantidade de sais minerais utilizados na composição da solução nutritiva, e a possibilidade de utilização da reconhecida fonte de nitrogênio de baixo custo que é a uréia, poderá contribuir significativamente para o aumento da viabilidade do processo de FES, e tornar viável a produção de mananase também em larga escala.

Após este estudo de otimização do processo produtivo e extração da mananase, a atividade da enzima atingiu uma média de  $179 \text{ U g}^{-1}$ , o que gerou um incremento de quase 1000% (um mil por cento), em relação às atividades prévias a este trabalho, utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger* LPB-28 (Capítulo I).

## CAPÍTULO III

### CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MANANASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger*, UTILIZANDO FRASCOS DE ERLENMEYER E COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA

#### RESUMO

Os materiais lignocelulósicos, como as cascas de soja, são compostos por celulose, hemicelulose e lignina e sua completa degradação requer a ação de várias enzimas. Em se tratando de fermentação no estado sólido (FES), vários biorreatores vem sendo desenhados visando melhorar a performance da para obtenção de bio-produtos. Esta pesquisa teve como objetivo principal estudar cineticamente a produção de mananase por *Aspergillus niger* LPB-28 em FES com casca de soja, utilizando frascos de Erlenmeyer e colunas de aeração forçada, num período total de 168 horas. Para tanto foram otimizadas a taxa de aeração e a umidade inicial das colunas. Em seguida diversas análises (pH, açúcares totais e redutores, atividade de água, biomassa fúngica, taxa respirométrica e parâmetros cinéticos) foram realizadas nos dois tipos de biorreatores. Além destas, a produção de xilanase e celulasas também foi avaliada. A melhor condição fermentativa para produção de mananase em biorreatores do tipo coluna foi com 70% de umidade inicial e 180 mL min<sup>-1</sup> de aeração. O tempo de 96 horas foi o melhor nas condições fermentativas utilizadas em frascos de Erlenmeyer, onde o fungo *A. niger* LPB-28 produziu mananase (146 U g<sup>-1</sup>) e elevados níveis de xilanase (942 U g<sup>-1</sup>). A produção de celulasas foi insignificante e em um maior intervalo de tempo. No biorreator do tipo coluna, a mananase foi produzida mais tardiamente (120 horas) e com teor inferior (84 U g<sup>-1</sup>) não relacionando a elevada biomassa fúngica apresentada neste biorreator à elevados rendimentos enzimáticos. O consumo de oxigênio foi mais intenso (entre 0,2 e 0,4 g/h), no intervalo entre 60 e 90 horas, caindo por volta de 100 horas. A análise de biomassa fúngica foi totalmente condizente com a biomassa estimada pelo e os parâmetros cinéticos gerados foram: velocidade específica = 0,01843 h<sup>-1</sup>, rendimento de biomassa em relação ao consumo de O<sub>2</sub> = 0,0077 e coeficiente de manutenção = 0,84735 g de O<sub>2</sub>/g de biomassa.h

Palavras-chave: Mananase, Cinética, Biomassa fúngica, Colunas de aeração forçada.

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com Juhász et al. (2005), a lignocelulose é o principal material da parede celular de plantas secundárias e, um dos polímeros mais comumente encontrados na natureza. A degradação deste material em açúcares monoméricos envolve ações combinadas de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, uma vez que os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

O complexo enzimático de celulose consiste de três tipos de enzimas que agem sinérgicamente na hidrólise da celulose: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidases (BHAT; BHAT, 1997). As endoglucanases atacam cadeias de celulose randomicamente e geram celu-oligossacarídeos. Exoglucanases clivam unidades de celobiose a partir da cadeia terminal de celuloses e, as  $\beta$ -glucosidases convertem a celobiose em glicose (BHAT; BHAT, 1997).

Foi somente na década de 90 que as celulases adquiriram significativa importância industrial. Sua eficiente utilização dentro da indústria têxtil foi comprovada pela ação como agente bio-polidor substituindo as pedras de lavagem, as quais ocasionavam a produção indesejada de penugens e fios nas fábricas (LANGE, 1993). Também possuem aplicação na indústria de papel e celulose, além de uma ampla variedade de uso na indústria de detergentes, podendo diminuir o desbotamento de vestuários coloridos através da remoção de felpas soltas que, quando presentes, refletem a luz de maneira difusa e fornecem a aparência desbotada (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Já as hemiceluloses podem ser classificadas em xilanas, mananas, arabinanas e galactanas, de acordo com o principal açúcar encontrado em suas estruturas (ASPINALL, 1980; Juhász et al., 2005). As xilanas possuem ligações  $\beta$ -D-1,4-xilopiranosídicas, enquanto que as mananas consistem de ligações  $\beta$ -1,4 de unidades de glicose e manose, as quais encontram-se distribuídas randomicamente (TIMELL, 1967; Juhász et al., 2005).

Por serem polímeros mais heterogêneos, várias enzimas são necessárias na degradação da hemicelulose. As enzimas mananase e xilanase degradam seus principais componentes, ao passo que,  $\beta$ -xilosidases e  $\beta$ -manosidases degradam ainda os xilo-oligossacarídeos (MARGOLLES-CLARK; ILMEN; PENTTILÄ, 1997).

De acordo com Joseleau, Comtat e Ruel (1992), a xilana possui significativa representação de biomassa renovável: aproximadamente 20 – 35% do peso seco de resíduos agroindustriais, tais como as cascas de soja utilizadas na forma de suporte e substrato, no processo de fermentação sólida adotado neste estudo.

O uso da xilanase na indústria de papel e celulose incrementa o processo de clareamento, diminuindo a quantidade de compostos químicos à base de cloro e, conseqüentemente, minimiza os efeitos nocivos causados no ambiente devido ao descarte destes organoclorados (GUTIERREZ-CORREA; TENDERDY, 1998). Xilanases possuem ainda, potenciais aplicações na bioconversão de material lignocelulósico para obtenção de produtos fermentados e também são capazes de aumentar a digestibilidade de agro-resíduos componentes de ração animal, além de serem utilizadas na clarificação de sucos, e melhoramento da consistência de cervejas, (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

As mananases, enzima e objeto principal deste estudo, possuem aplicações industriais/comerciais nas mais diversas áreas, descritas em Capítulos anteriores e, com maior detalhamento no sub-item 3.5.1 da Revisão Bibliográfica desta Dissertação.

Em geral, todas as enzimas aqui citadas são induzidas em células microbianas (BIELY, 1993; KUBICEK et al., 1993). Potenciais fontes de enzimas hidrolíticas de parede celular de plantas, os fungos filamentosos são mais atrativos do que as bactérias, devido aos elevados níveis destas enzimas que secretadas no meio de cultivo (OKAFOR et al., 2007).

Vários biorreatores vem sendo desenhados visando melhorar o desempenho da fermentação no estado sólido para obtenção de bio-produtos e, portanto, este estudo objetivou realizar uma comparação da produção de mananase, xilanase e celulasas em dois modelos de biorreatores: frascos de Erlenmeyer (onde a aeração ocorre por difusão), e colunas com aeração forçada, utilizando cascas de soja como suporte/substrato para o fungo filamentoso *Aspergillus niger* LPB-28 produzir as enzimas de interesse.

Para tanto, foi conduzido um estudo da cinética de produção destas enzimas (total de 168 horas) com diversas análises ao longo do tempo: atividade enzimática, atividade mananolítica específica, pH, açúcares fermentescíveis (totais e redutores), atividade de água ( $a_w$ ), produção de biomassa fúngica, consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$  (biorreatores do tipo colunas).



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* LPB-28, cultivado e selecionado de acordo com estudo anterior (Capítulo I).

### 2.2 SUPORTE/SUBSTRATO

Cascas de soja (cedidas pela Imcopa<sup>®</sup>) foram utilizadas como suporte/substrato para a FES. As cascas foram peneiradas manualmente para obtenção de tamanho da partícula intermediário, compreendido entre 0,8 e 2,0 mm.

### 2.3 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado de acordo com o sub-item 2.5 do Capítulo I, com redução do tempo de incubação a 28 °C para 144 horas.

### 2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UMIDADE E AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE MANANASE EM BIORREATOR DO TIPO COLUNAS

O estudo da influência da aeração forçada no processo de produção de mananase por *Aspergillus niger* LPB-28 foi conduzido em biorreatores do tipo colunas com aeração forçada. Além do estudo da aeração, fez-se necessária a análise da umidade que propicia uma melhor produção da enzima estudada.

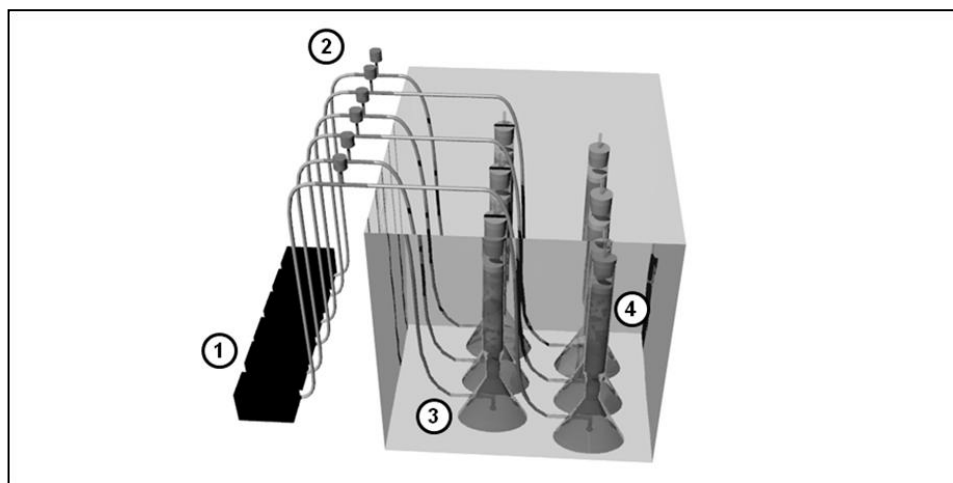
O planejamento aplicado para os estudos neste sistema foi do tipo fatorial completo:  $2^2$  com 2 repetições no ponto central. Os níveis estudados para umidade foram 60%, 65% e 70%, e para aeração foram 60 mL.min<sup>-1</sup>, 120 mL.min<sup>-1</sup> e 180

mL.min<sup>-1</sup>, conforme Tabela 1. Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

**Tabela 1.** Níveis das variáveis estudadas: umidade e taxa de aeração

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Taxa de aeração (mL.min <sup>-1</sup> )	Ar	60	120	180
Umidade inicial (%)	%	60	65	70

O sistema utilizado nesta etapa é constituído de colunas de vidro que contêm o material a ser fermentado. Estas colunas são conectadas em borbulhadores de ar de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de água destilada, para umedecer o ar antes de sua passagem pelo incubador. As colunas são introduzidas em uma cuba de vidro que contem água mantida na temperatura desejada com auxílio de aquecedor e controlada por um termostato. Cada coluna é acoplada a uma válvula que permite ajustar a vazão de ar controlado através de um rotâmetro na saída de ar da coluna (Figura 1).



**Fig. 1.** FES em colunas de vidro: 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura. *Fonte:* Rodrigues, 2010.

Estas colunas de vidro possuem 4 cm de diâmetro e 20 cm de altura. Utilizou-se 60 g de substrato úmido (60 – 70%). A inoculação foi realizada no próprio frasco e após homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. A aeração foi ajustada entre 60 a 180 mL.min<sup>-1</sup>. As colunas vazias, bem como os borbulhadores de ar de 250 mL (contendo 200 mL de água deionizada) foram esterilizados separadamente a 121 °C durante 15 minutos.

O substrato (casca de soja) e a solução nutritiva composta por 0,7 g/L de uréia e 1,0 g/L de sulfato de manganês, foram esterilizados separadamente em frasco do tipo Becker.

A inoculação ( $1 \times 10^7$  esporos de *A. niger* LPB-28/g de casca de soja) foi realizada no próprio Becker e após homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente, em câmara de fluxo laminar, com a mistura de substrato, solução nutritiva e inóculo. Cada coluna foi pesada antes e após preenchimento com o substrato.

Posteriormente, as colunas foram conectadas aos borbulhadores de ar e vedadas com fita do tipo veda-rosca, sendo então introduzidas na cuba de vidro que continha água com temperatura controlada a 28 °C.

## 2.5 PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

### 2.5.1 Em frascos de Erlenmeyer – aeração por difusão

O processo fermentativo foi conduzido utilizando frascos de Erlenmeyer (125 mL), em duplicata, com 5 g de casca de soja, à qual foi adicionada, além do inóculo, solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1,0 g/L) para obtenção do teor de umidade inicial de 70% . Os frascos foram incubados a 28 °C durante 168 horas.

A cada 24 horas de fermentação foram analisados os açúcares consumidos pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), além do pH, umidade final, e  $a_w$  (determinados por método potenciométrico). A extração e análise das enzimas produzidas (mananase, xilanase e celulasas) foram procedidas de acordo com os sub-itens 2.6 e 2.7.

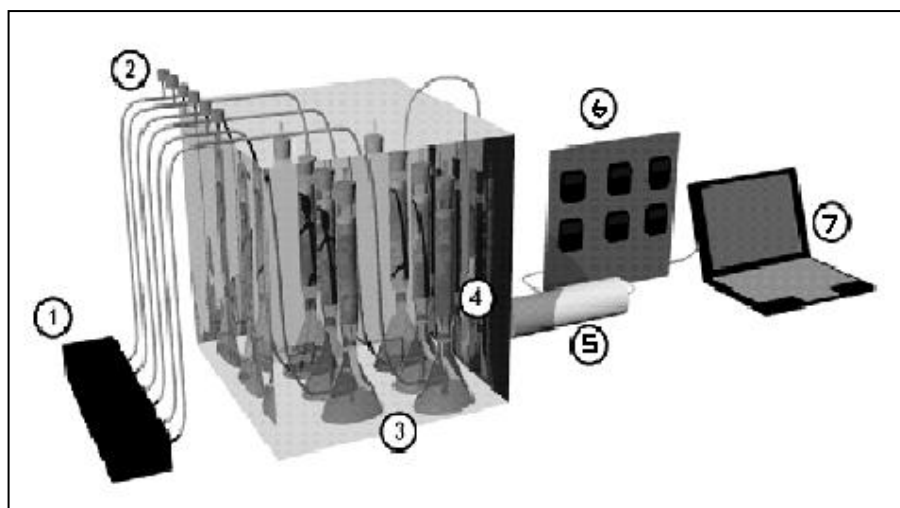
### 2.5.2 Em colunas de vidro – aeração forçada

Um estudo de mudança de sistema fermentativo para avaliação da produção de mananase (enzima alvo) e xilanase foi realizado utilizando-se biorreatores do tipo

colunas com aeração forçada, nas condições químicas otimizadas em frascos de Erlenmeyer (Capítulo II) e físicas otimizadas conforme descrito no sub-item 2.4.

Durante 168 horas foram analisados os açúcares consumidos pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), além do pH, umidade final, e  $a_w$  (determinados por método potenciométrico). A extração e análise das enzimas produzidas (mananase e xilanase) foram procedidas de acordo com os sub-itens 2.6 e 2.7.

As análises de consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$  foram realizadas com auxílio de sensores conectados ao sistema de fermentação em colunas e a um computador que realizou a coleta de dados utilizando o “software” Fersol II, desenvolvido no Laboratório de Processos Biotecnológicos (Figura 2). Para realizar a aquisição de dados, as variáveis de fermentação foram monitoradas e controladas por um computador pessoal, em tempo real, concebido sob plataforma LAquis (LCDS, Brasil). O consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$  foram monitorados com um sensor de oxigênio ( $O_2$ -sensor modelo A2 Alphasense Ltd. - Reino Unido) na entrada e um sensor de  $CO_2$  (sensor Vaisala modelo GMT220 Carbocap - Finlândia) na saída da coluna.



**Fig.2.** FES em colunas de vidro com análise de  $O_2$  e  $CO_2$ : 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura; 5) estrutura contendo os sensores; 6) painel de controle; 7) computador para aquisição de dados e controle pelo “software”. Fonte: Rodrigues, 2010.

## 2.6 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Para obtenção do extrato bruto enzimático, o fermentado foi homogeneizado com solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 numa proporção 1:10 e submetido a agitação vigorosa em agitador magnético durante 20 minutos. A mistura foi filtrada em papel TNT e centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi novamente filtrado em papel filtro Whatman nº 1, e submetido à determinação da atividade enzimática.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Todas as análises deste sub-item foram realizadas em triplicata.

### 2.7.1 Atividade de mananase

Para determinar a atividade da mananase, foram feitas análises de acordo com o sub-item 2.8 do Capítulo I, utilizando filtrado enzimático diluído apropriadamente em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0. Os resultados da atividade mananolítica foram expressos em  $\text{U g}^{-1}$  de matéria seca.

### 2.7.2 Atividade de xilanase

Para determinar a atividade de xilanase, uma alíquota de 0,2 mL do filtrado enzimático diluído apropriadamente em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 foi misturada a 1,8 mL de solução de xilana ("*birchwood xylan*") 1% e incubado durante 5 minutos em banho-maria a 50 °C, conforme Bailey, Biely e Poutanen (1992). Os açúcares redutores liberados (produto da reação) foram quantificados após adição de 3,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), em cada tubo teste que permaneceu por 5 minutos em banho de ebulição (MILLER, 1959).

Os valores de absorbância lidos em 540 nm foram transformados em  $\mu\text{moles}$  de xilose utilizando uma curva padrão construída com 2 – 10  $\mu\text{mol/mL}$  de uma

solução estoque de xilose com concentração igual a 1,5 g/L. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto, nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em  $\text{U g}^{-1}$  de matéria seca.

### 2.7.3 Atividade de celulases

Para determinar a atividade das celulases (endo e exo-celulases), foram utilizados como substrato carboxi-metil-celulose (CMC) e papel de filtro (FP de “*filter paper*”), respectivamente conforme metodologia descrita por Ghose (1987).

Para as endo-celulases, uma alíquota de 0,5 mL do filtrado enzimático diluído apropriadamente em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 foi misturada a 1,0 mL de solução de CMC 2% e incubado durante 30 minutos em banho-maria a 50 °C.

Já para determinação das exo-celulases, uma alíquota de 0,5 mL do filtrado enzimático diluído apropriadamente em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 foi misturada a um pedaço de papel filtro (1,0 x 6,0 cm) e 1,0 mL de solução tampão, seguido por incubação durante 60 minutos em banho-maria a 50 °C.

Os açúcares redutores liberados (produto da reação) foram quantificados após adição de 3,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), em cada tubo teste que permaneceu por 5 minutos em banho de ebulição (MILLER, 1959).

Os valores de absorbância lidos em 540 nm foram transformados em  $\mu\text{moles}$  de glicose utilizando uma curva padrão construída com 0 – 10 g/L. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

Os resultados para CMCase e FPase foram expressos em  $\text{U g}^{-1}$  de matéria seca.

### 2.7.4 Determinação da atividade específica de mananase

Os teores protéicos nas preparações enzimáticas da mananase foram determinados conforme descreve Bradford (1976). A mistura de reação contendo

100  $\mu\text{L}$  de amostra e 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford foi deixada em repouso por 5 min ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm e a concentração de proteínas foi obtida por uma curva padrão com 0 – 0,1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). Os resultados para a atividade específica de mananase foram expressos em  $\text{U mg}^{-1}$  (unidades de atividade enzimática por mg de proteína).

## 2.8 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA

Utilizou-se a metodologia de dosagem do ergosterol presente na membrana celular de fungos (no caso, a linhagem *Aspergillus niger* LPB-28) para determinação do crescimento microbiano ao longo do tempo, tanto na fermentação ocorrida em frascos de Erlenmeyer, como no biorreator do tipo colunas com aeração forçada.

O ergosterol foi extraído em hexano sendo analisado por cromatografia líquida de alta performance - HPLC (SEITZ, 1979).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UMIDADE E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE MANANASES EM BIORREATOR DO TIPO COLUNA

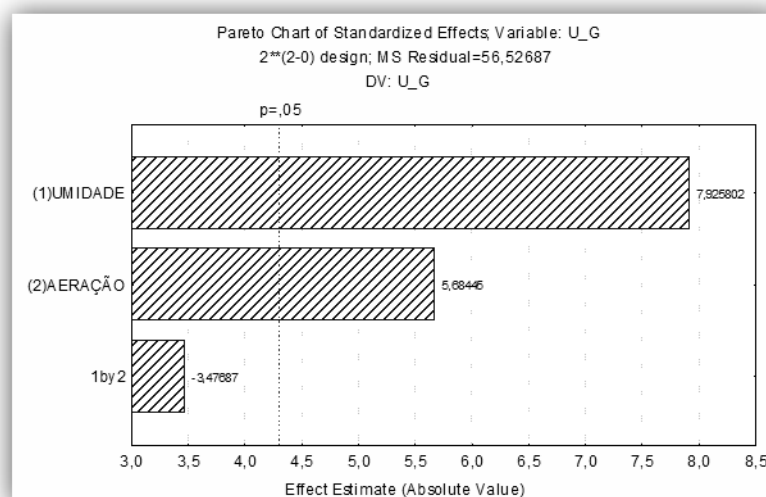
Neste estudo os fatores umidade inicial e taxa de aeração forçada em biorreatores do tipo coluna foram relacionados para maximizar a produção da mananase.

O planejamento experimental e os resultados estão dispostos na Tabela 2, onde se observa que a maior atividade de mananase ( $169,42 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtida com a máxima taxa de aeração forçada  $180 \text{ mL.min}^{-1}$  e umidade inicial (70%). Correspondentemente a menor atividade mananaolítica ( $67,09 \text{ U g}^{-1}$ ) foi observada quando utilizadas a menor taxa de aeração forçada  $60 \text{ mL.min}^{-1}$  e umidade inicial (60%).

**Tabela 2.** Planejamento experimental fatorial completo  $2^{(2-0)}$  com duas repetições do ponto central, para estudo de umidade e aeração forçada do processo de FES em colunas para produção de mananase

Experimento	Níveis		Atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$ )
	Umidade (%)	Aeração ( $\text{mL.min}^{-1}$ )	
1	70	180	169,42
2	70	60	152,82
3	60	180	135,97
4	60	60	67,09
5	65	120	136,26
6	65	120	142,91

No diagrama de Pareto (Figura 3), observa-se que ambas as variáveis foram significativas ( $p \leq 0,05$ ), porém, a umidade inicial apresentou maior significância do que a aeração forçada.



**Fig.3.** Diagrama de Pareto mostrando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) nas condições de umidade e aeração forçada para produção de mananase por FES em colunas

Na análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 3, ambos os fatores, umidade e aeração foram significativos ( $p \leq 0,05$ ), porém a interação da umidade com aeração forçada não demonstrou significância ( $p = 0,07$ )

A significância estatística da equação foi checada e a determinação do coeficiente ( $R^2$ ) foi calculado em 0,98, indicando que 98% da variabilidade de resposta pode ser explicada pelo modelo adotado.



**Tabela 3.** ANOVA da otimização das condições de umidade e taxa de aeração forçada para produção de mananase por FES em biorreator do tipo coluna

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1)UMIDADE	3550,924	1	3550,924	62,81834	0,015549
(2)AERAÇÃO	1826,551	1	1826,551	32,31297	0,029581
1 com 2	683,331	1	683,331	12,08861	0,073695

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

Em condição fermentativa semelhante, Heck, Soares e Ayub (2005) verificaram a produção de mananase por uma linhagem de *Bacillus circulans* cultivado em um biorreator cilíndrico preenchido com resíduo fibroso de soja e solução nutritiva, a melhor produção de mananase também foi obtida com a maior taxa de aeração que, no caso, foi de 800 mL min<sup>-1</sup>. Esta taxa de aeração significativamente superior à utilizada nesse trabalho pode ser obtida graças ao tipo de biorreator por eles utilizados, entretanto, fica impossível comparar as atividades de mananase obtidas pois os autores divulgaram apenas as atividades específicas para a mananase.

O melhor teor de umidade sugerido com o estudo em colunas foi o mesmo determinado como melhor na otimização em frascos de Erlenmeyer (70%) apresentada no Capítulo II. Entretanto, antes de afirmar qual seria a escolha do modelo de biorreator fez-se necessária a realização de um estudo cinético comparativo da produção da enzima alvo (mananase). Neste estudo outras enzimas que pudessem estar sendo produzidas concomitantemente foram testadas. Para a continuidade do trabalho foram empregadas as seguintes condições: aeração de 180 mL.min<sup>-1</sup> e umidade inicial em 70%.

### 3.2. ESTUDO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM FRASCOS DE ERLLENMEYER E BIORREACTORES DO TIPO COLUNAS

#### 3.2.1. Cinética da produção de enzimas em frasco de Erlenmeyer

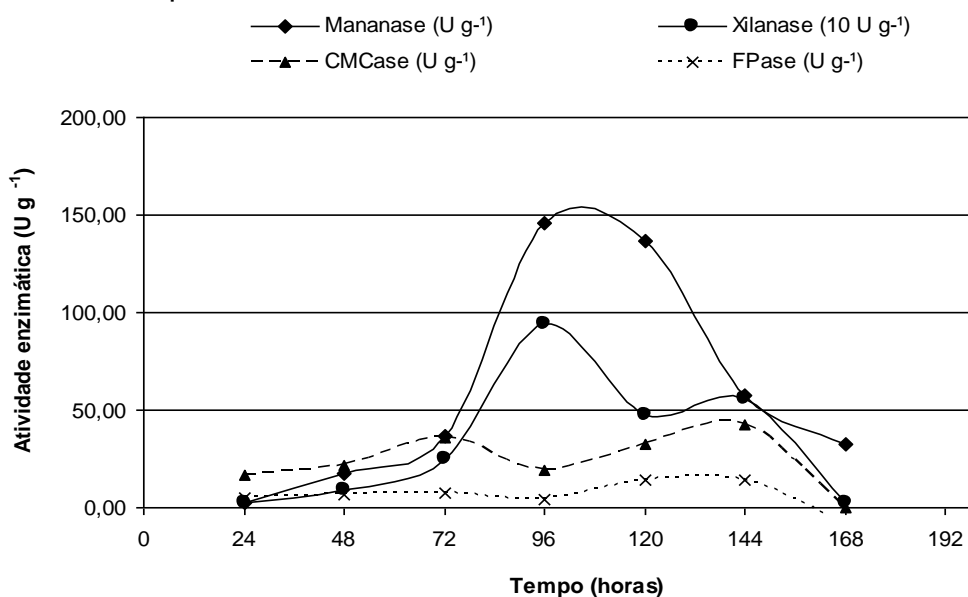
A Figura 4 apresenta os resultados do estudo da cinética de produção de enzimas por *Aspergillus niger* LPB 28 em FES utilizando frascos de Erlenmeyer. O

foco principal deste estudo continuou sendo a produção de mananase, porém outras enzimas foram avaliadas tais como a xilanases e celulasas (CMCases e FPases).

A produção de mananase atingiu seu ápice ( $145,89 \text{ U g}^{-1}$ ) em 96 horas.

No Capítulo II, o processo fermentativo foi otimizado para a produção de mananase, e apesar disso, os resultados revelaram excelentes rendimentos de xilanase, dados que confirmam a informação de que a fração hemicelulósica encontrada nos vegetais são compostas majoritariamente por xilana (JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992). A atividade xilanolítica também atingiu seu máximo ( $942,6 \text{ U g}^{-1}$ ) em 96 horas.

A produção mais elevada de celulasas ( $42,23$  e  $14,15 \text{ U g}^{-1}$  para CMCase e FPase, respectivamente) ocorreu mais tardiamente, em 144 horas. Tal fato demonstra que o fungo necessita da mais tempo para degradar a celulose presente no substrato/suporte.



**Fig.4.** Estudo da cinética de produção de enzimas em frascos de Erlenmeyer

Conforme apresentado na Figura 4, uma correlação pode ser observada no perfil das produções de xilanase e celulasas, mas não com mananase, assim como relatado no estudo de Margolles-Clark et al. (1997), o qual indica que mananases não são co-produzidas com celulasas na maioria das fontes de carbono por eles avaliadas.

Techapun et al. (2001) observaram a produção de xilanases em frascos de Erlenmeyer com uma linhagem de *Streptomyces* e diferentes fontes de carbono e, em todas elas, a melhor produção foi obtida em 144 horas. Com cascas de soja, a

máxima produção foi de  $2,5 \text{ U mL}^{-1}$  (nesta unidade de medida a melhor atividade xilanolítica do nosso estudo foi de  $196 \text{ U mL}^{-1}$ ).

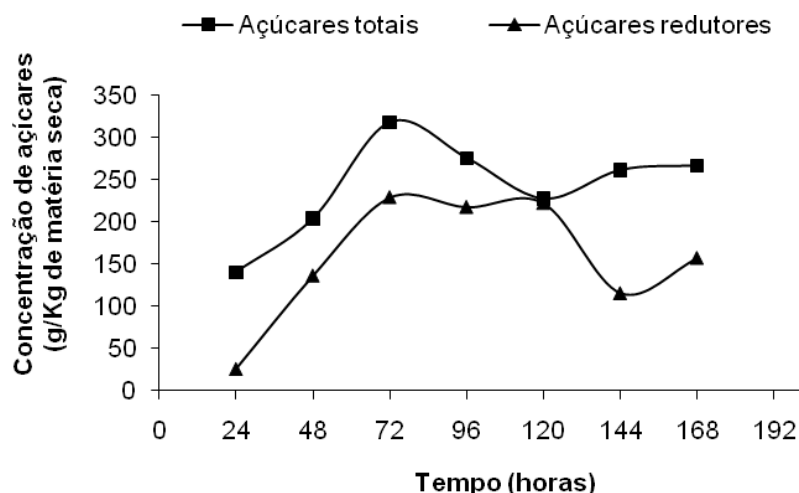
Großwindhager et al. (1999) cultivaram uma linhagem de *Sclerotium rolfsii* em biorreator de 20 L, sem ajuste de aeração utilizando meio sintético. As melhores atividades de mananse, xilanase, CMCase e FPase foram todas obtidas em torno de 200 horas de fermentação.

Conforme a Tabela 4, em frascos de Erlenmeyer a atividade de água inicia próxima de 1,0 e decresce ao longo do tempo. Importante notar que estas diferenças são insignificantes uma vez que variam apenas entre 0,97 e 1,0. A  $a_w$  mostrou-se sempre favorável ao desenvolvimento do fungo, já que os valores recomendados estão em torno de 0,9 (WARD, 1989). O pH se manteve ácido (entre 2,7 e 4,3) durante todo o tempo do processo fermentativo, aproximando-se mais da neutralidade, dentro da faixa observada, em 144 horas ( $\text{pH} = 4,3$ ).

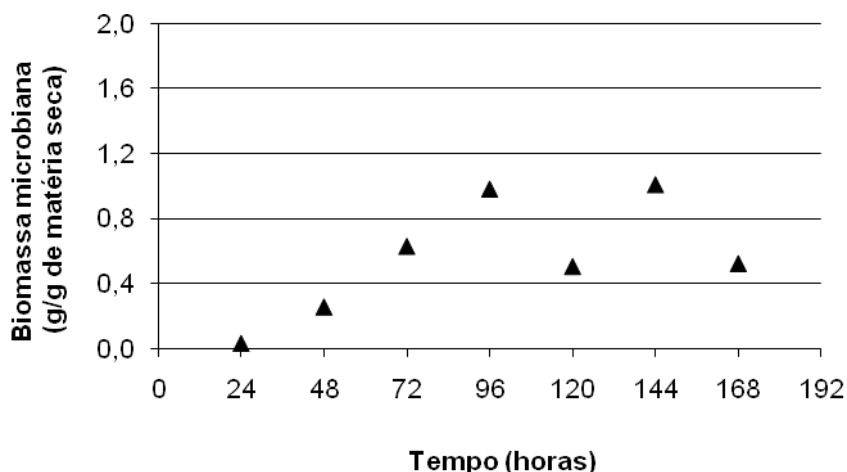
**Tabela 4.** pH e  $a_w$  do estudo cinético em frascos de Erlenmeyer

Tempo (h)	pH	$a_w$
48	3,5	0,993
72	3,9	0,977
96	3,8	0,973
120	3,7	0,981
144	4,3	0,973
168	3,8	0,978

Os açúcares totais e redutores apresentam máxima concentração em 72 horas do processo (318,01 e 228,62 g/Kg de matéria seca, respectivamente), o que mostra que até este momento ocorreu a degradação da hemicelulose e celulose, presentes na casca de soja, em açúcares fermentescíveis, os quais vão sendo consumidos pelo fungo para o seu crescimento e produção de metabólitos (Figuras 5 e 6).



**Fig.5.** Cinética do consumo de açúcares por *A.niger* LPB-28 em frascos de Erlenmeyer



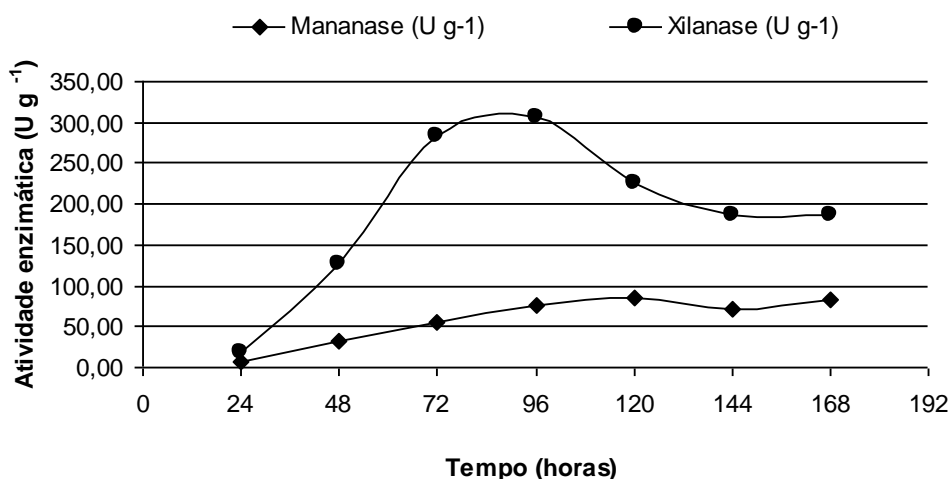
**Fig.6.** Cinética da biomassa de *A.niger* LPB-28 em frascos de Erlenmeyer

### 3.2.2. Cinética da produção de enzimas em biorreatores do tipo colunas

A Figura 7 apresenta os resultados do estudo da cinética de produção de enzimas em biorreatores do tipo colunas com aeração forçada por *Aspergillus niger* LPB-28 em FES. Neste caso somente a produção de mananase e xilanase foi analisada, uma vez que a produção de celulasas não foi significativa em estudo anterior. A produção de mananase atingiu seu ápice ( $84,84 \text{ U g}^{-1}$ ) em 120 horas.

Assim como o estudo cinético em frascos de Erlenmeyer, os resultados revelaram excelentes rendimentos de xilanase atingindo seu máximo valor ( $306,25 \text{ U g}^{-1}$ ) mais cedo, em 96 horas.

No entanto, a produção das duas enzimas (mananase e xilanase) foi inferior neste modelo de biorreator, mostrando que a aeração forçada não foi favorável à produção das enzimas.



**Fig.7.** Estudo da cinética de produção de enzimas em biorreatores do tipo coluna com aeração forçada

Conforme a Tabela 5, em biorreatores do tipo colunas a atividade de água ( $a_w$ ) novamente apresentou resultados muito próximos a 1,0 ao longo de todo o processo fermentativo. Tal fato se deve à passagem de ar saturado através do sistema, o qual mantém o meio sempre umedecido.

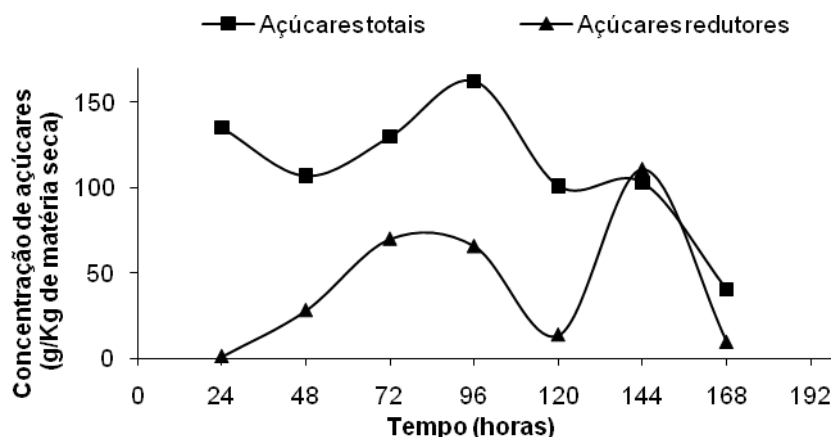
O pH se manteve ácido na faixa compreendida entre 2,8 e 4,0 durante todo o tempo do processo fermentativo, com pico mais próximo ao neutro, dentro da faixa observada, em 144 horas.

**Tabela 5.** pH e  $a_w$  do estudo cinético em biorreatores do tipo coluna com aeração forçada

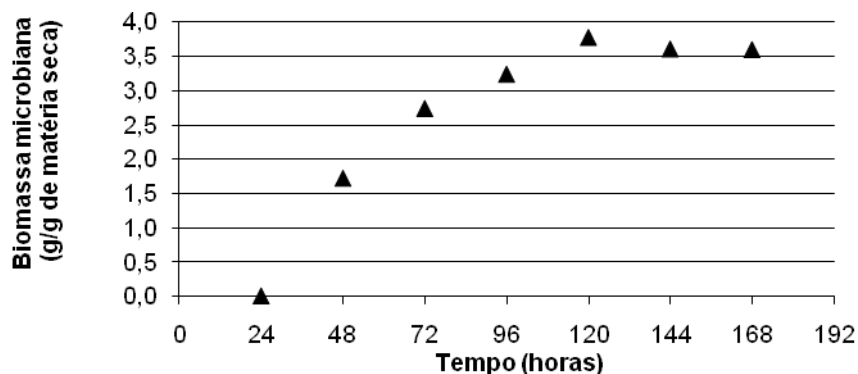
Tempo (h)	pH	$a_w$
24	2,8	0,993
48	3,1	0,994
72	3,8	0,995
96	3,2	1,004
120	3,5	0,989
144	4,0	0,995
168	3,8	0,996

Em biorreatores do tipo coluna, os açúcares totais apresentam altas concentrações em 96 horas (162,48 g/Kg de matéria seca), enquanto que, os redutores em 144 horas (111,13 g/Kg de matéria seca) (Figura 8).

O perfil da concentração em açúcares ao longo do tempo pode ser também observado na biomassa fúngica (Figura 9), relacionando o crescimento microbiano com a degradação da hemicelulose presente na casca de soja. Essa degradação gera um decréscimo na concentração de açúcares totais e conseqüentemente, aumento na concentração de açúcares redutores, ao longo do tempo de fermentação.



**Fig.8.** Cinética do consumo de açúcares por *A.niger* LPB-28 em colunas com aeração forçada



**Fig.9.** Cinética da biomassa de *A.niger* LPB-28 em colunas com aeração forçada

As diferenças na produção de mananase ( $85 \text{ U g}^{-1}$  em colunas contra  $146 \text{ U g}^{-1}$  em frascos) e outras enzimas nos dois bioreatores pode ser explicada pela influência da aeração forçada, a qual não foi positiva para a produção da enzima mas, se mostrou efetiva para o incremento da biomassa fúngica, em ambos biorreatores.

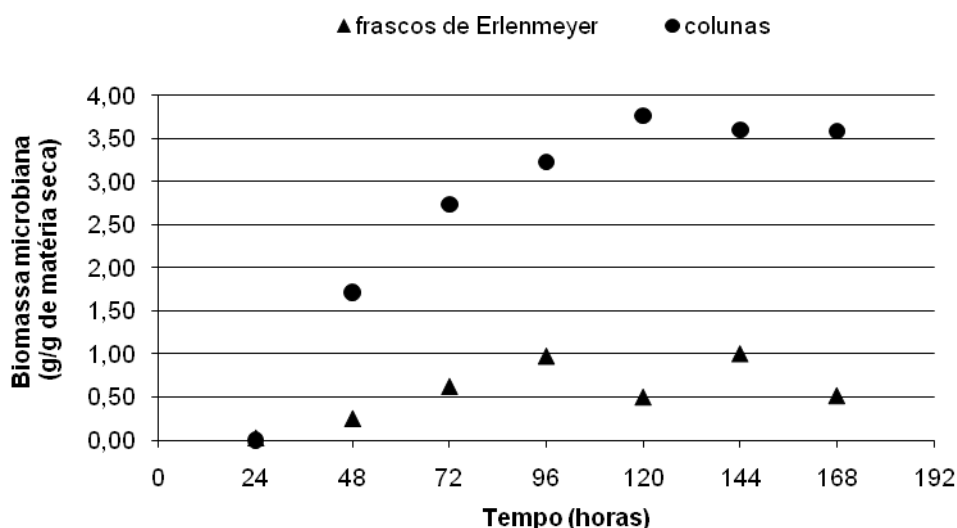
Heck, Soares e Ayub (2005), nas condições fermentativas comentadas anteriormente, observaram a melhor produção de mananase e também xilanase, em 168 e 120 horas, respectivamente.

### 3.2.3. Cinética da produção de biomassa durante a produção de enzimas

A Figura 10 mostra a biomassa fúngica obtida ao longo do processo, tanto em frascos de Erlenmeyer como em biorreatores do tipo colunas. É possível visualizar a fase log na faixa de 96 a 120 horas. Já a fase estacionária é compreendida no período entre 96 e 144 horas para frascos de Erlenmeyer e, entre 120 e 168 horas para as colunas com aeração forçada. Após este período, ocorre um decréscimo de biomassa, finalizando a curva de crescimento microbiano.

A produção de biomassa em frascos de Erlenmeyer atingiu um máximo teor em 96 horas (0,98 g/g de fermentado seco). A biomassa fúngica correspondente a 120 horas encontra-se fora da curva devido provavelmente devido a um erro experimental.

Em colunas, a biomassa microbiana apresenta-se durante toda a cinética mais alta, atingindo o máximo de 3,77 g/g de fermentado seco, em 120 horas. Neste biorreator a produção de mananase mostrou-se inferior, o que torna possível prever que a produção de biomassa de *Aspergillus niger* LPB-28 não está correlacionada à produção desta enzima.

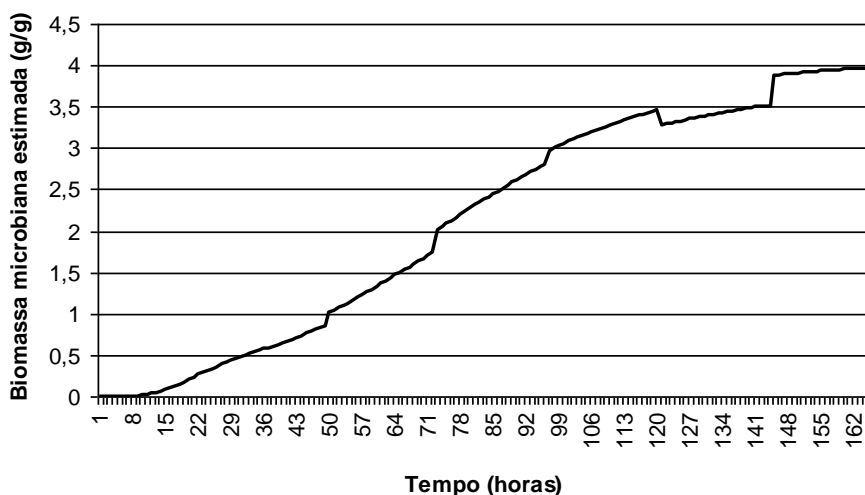


**Fig.10.** Evolução da biomassa do fungo *Aspergillus niger* LPB 28 durante a produção de enzimas realizada em frascos de Erlenmeyer e colunas com aeração forçada

Através do programa Fersol II foi possível estimar a biomassa produzida em biorreatores de colunas. Pode-se observar na Figura 11 que a biomassa atinge a fase estacionária aproximadamente em 144 horas de fermentação. Tal resultado

mostra uma correlação satisfatória entre a biomassa experimental e a biomassa estimada.

Os resultados da biomassa e de *A. niger* estimados pelo “software” e apresentados em g de biomassa estimada / g de matéria seca, foram praticamente idênticos ao obtido pela dosagem do ergosterol, confirmando a eficiência da análise experimental.



**Fig.11.** Evolução da biomassa estimada do fungo *Aspergillus niger* LPB-28 durante a produção de enzimas

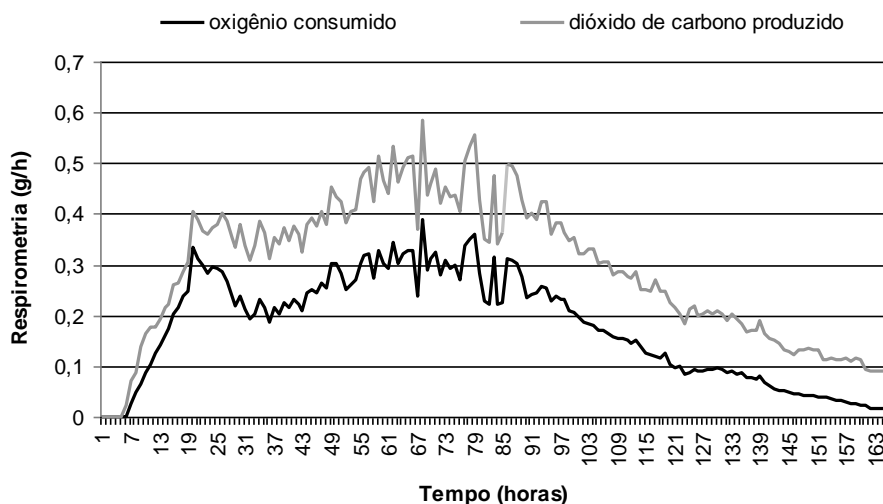
O método baseado na dosagem de ergosterol, descrito por Seitz et al. (1979), foi escolhido devido à impossibilidade de separação da biomassa fúngica do substrato sólido. O crescimento do fungo pode ser monitorado através da mensuração de componentes químicos como a quitina e o ergosterol, por exemplo. A quitina é um constituinte da parede celular da maioria dos fungos e é o componente mais comumente mensurado (DONALD; MIROCHA, 1977).

Já o ergosterol não é amplamente utilizado, porém, é o componente esteroide predominante na maioria dos fungos e encontra-se ausente ou numa constituição ínfima em plantas superiores (NESS, 1977). No mais, de acordo com Seitz et al. (1979), este método apresenta inúmeras vantagens para mensurar o aumento da biomassa fúngica em FES como por exemplo, a sensibilidade ao crescimento em curto espaço de tempo, e a facilidade e rapidez quando comparado ao ensaio com quitina.

Na Figura 12 observa-se a evolução do consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$  durante o processo de produção de enzimas. É notável o consumo de oxigênio mais intenso compreendido entre 0,2 e 0,6 g/h, no intervalo entre 12 e 100 horas de



fermentação, o que representa uma maior atividade metabólica durante este período correspondente à fase exponencial de produção das enzimas avaliadas.



**Fig.12.** Consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono durante o processo de produção de mananase por *Aspergillus niger* LPB-28

Com o auxílio do programa Fersol II foi possível igualmente determinar os parâmetros cinéticos do processo de produção de enzimas por *Aspergillus niger* LPB-28 em FES (Tabela 6).

O coeficiente de manutenção foi de 0,84735 g de O<sub>2</sub>/g de biomassa.h e indica que houve um consumo razoável de energia (recursos disponíveis), na própria manutenção da vida e na formação da biomassa.

O rendimento foi de 0,0077 e demonstra a relação entre o que foi consumido na respiração e o que foi produzido em biomassa. Este parâmetro é adimensional e, o resultado é coerente, pois demonstra que o fungo *Aspergillus niger* precisa consumir oxigênio para se proliferar. Um rendimento maior indicaria que o microrganismo em questão teria capacidade de se proliferar bastante sem ter a necessidade de consumir oxigênio no processo.

A velocidade específica foi de 0,01843 h<sup>-1</sup>.

**Tabela 6.** Parâmetros cinéticos da produção de enzimas pelo fungo *Aspergillus niger* LPB-28

Parâmetros	Valores
Velocidade específica ( $\mu$ )	0,01843 h <sup>-1</sup>
Rendimento de biomassa em relação ao consumo de O <sub>2</sub>	0,0077
Coeficiente de manutenção (m)	0,84735 g de O <sub>2</sub> /g de biomassa.h

## 4 CONCLUSÕES

A otimização das condições fermentativas para produção de mananase em biorreatores do tipo coluna de aeração forçada foi realizada com sucesso (98% da variabilidade de resposta pode ser explicada pelo modelo adotado), e as melhores condições foram definidas em umidade de 70% e taxa de aeração máxima ( $180 \text{ mL min}^{-1}$ ).

No período fermentativo compreendido em 96 horas *Aspergillus niger* LPB-28 produziu em frascos de Erlenmeyer por FES, com casca de soja, mananase ( $146 \text{ U g}^{-1}$ ) e elevados níveis de xilanase ( $942 \text{ U g}^{-1}$ ). A produção de celulasas também foi obtida, porém, em taxas menores e em um maior intervalo de tempo.

No biorreator do tipo coluna com aeração forçada, a mananase foi produzida mais tardiamente (120 horas) e com teor inferior ( $84 \text{ U g}^{-1}$ ) ao obtido em frascos de Erlenmeyer, o que evidencia a preferência do fungo por aeração difusa, porém, não relaciona o elevado crescimento fúngico à elevados rendimentos na produção enzimática.

Este estudo cinético provou ser indispensável e muito satisfatório já que um decréscimo de 72 horas no processo de FES para a produção de mananase foi obtido. Anteriormente à este estudo, a interrupção do processo fermentativo era realizada em 168 horas, e agora em 96 horas, um excelente resultado que pode significar relevante economia na escala industrial.

A biomassa de *Aspergillus niger*, avaliada pela dosagem do ergosterol indica a necessidade de oxigênio para o aumento da biomassa já que os teores obtidos em colunas foram superiores aos apresentados pelos frascos de Erlenmeyer. Esta análise de biomassa foi totalmente condizente com a biomassa estimada pelo “software” Fersol II e os parâmetros cinéticos gerados.

A taxa respirométrica avaliada foi condizente com o período em que as enzimas estão sendo produzidas em fase exponencial e também com o crescimento de biomassa proporcionado pelo consumo dos açúcares obtidos da degradação enzimática.

## CAPÍTULO IV

### CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO MANANOLÍTICO, OBTIDO POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger*

#### RESUMO

Os resíduos agroindustriais são biodegradáveis e podem ser utilizados na obtenção de produtos de elevado valor como as enzimas. Servem ainda como fonte energética de baixo custo para processos de fermentação que promovem a obtenção de vários outros produtos destinados a uso humano e animal. Recentemente, a fermentação no estado sólido (FES) vem se tornando uma atrativa alternativa à fermentação submersa, devido a seu baixo custo e capacidade de aplicação destes resíduos, minimizando problemas ambientais. As mananases são enzimas hidrolíticas que clivam randomicamente as ligações  $\beta$ -1,4-D-manopiranosídicas, encontradas no material hemicelulósico, o qual está presente nas células vegetais e, por isso, possui aplicações em vários segmentos industriais que utilizam vegetais como matéria-prima principal ou, em alguma etapa de seus processos. Como objetivo principal, realizou-se a caracterização e avaliação da estabilidade da mananase no seu estado bruto, produzida por *Aspergillus niger* LPB-28 pela técnica de FES com cascas de soja como substrato/suporte. A mananase bruta produzida suporta e prefere condições ácidas (pHs 3,0 e 4,0) e temperaturas de até 60 °C, sendo inibida por todos os íons metálicos testados e tendo o  $Mn^{2+}$  como o mais fraco inibidor. O Km obtido foi de 5,25 mg mL<sup>-1</sup> e a V<sub>máx</sub> de 25  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>. A enzima apresentou estabilidade ao final de 720 horas em todas as condições de armazenamento testadas (25, 4, -20 e -80 °C), e também excelente resposta ao processo de liofilização sem adição de nenhum crioprotetor. O processo de liofilização se mostrou ainda como uma ótima ferramenta para concentrar a atividade da mananase chegando a 6140 U g<sup>-1</sup> de matéria seca.

Palavras-chave: Mananase, Caracterização, Estabilidade, Liofilização.

## 1 INTRODUÇÃO

A estrutura molecular de uma enzima é bastante frágil e, sabe-se que há muitos anos, a preparação industrial de enzimas tem se defrontado com os reconhecidos problemas de estabilidade frente ao calor, diferentes valores de pHs, presença de íons metálicos, agentes oxidantes e inibidores (MORETTO, 1992; Dias et al., 2002).

Moretto (1992) também afirma que é difícil estabelecer de modo específico e sistemático, todos os fatores que causam redução da atividade de uma enzima ou de uma classe de enzimas, no decorrer do tempo.

Segundo Colombatto et al. (2003), a completa caracterização dos produtos enzimáticos antes de sua aplicação final é extremamente importante, uma vez que visa um correto e eficaz destino para aplicação do bioproduto que é a enzima, como por exemplo, a mananase, obtida neste estudo através da fermentação de cascas de soja pelo fungo *Aspergillus niger* LPB-28.

Os objetivos do presente Capítulo foram caracterizar e avaliar a estabilidade do extrato bruto mananolítico em diferentes condições, tais como temperatura, pH, íons metálicos, condições de armazenamento e resposta ao processo de liofilização.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* LPB-28, cultivado e selecionado de acordo com estudo anterior (Capítulo I).

### 2.2 SUPORTE/SUBSTRATO

Cascas de soja (cedidas pela Imcopa<sup>®</sup>) foram utilizadas como suporte/substrato para a FES. As cascas foram peneiradas manualmente para obtenção de tamanho de partícula intermediário, compreendido entre 0,8 e 2,0 mm.

## 2.3 PREPARO DO INÓCULO E PROCESSO DE FES

O inóculo foi preparado de acordo com o sub-item 2.5 do Capítulo I, com redução do tempo de incubação a 28 °C para 144 horas.

O processo fermentativo foi conduzido em frascos de Erlenmeyer (125 mL) com 5 g de casca de soja, à qual foi adicionada, além do inóculo, solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1,0 g/L) para obtenção do teor de umidade inicial de 70% . Os frascos foram incubados a 28 °C durante 96 horas.

## 2.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Para obtenção do extrato bruto enzimático, o procedimento foi realizado de acordo com o sub-item 2.6 do Capítulo III.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ATIVIDADE ESPECÍFICA

### 2.5.1 Atividade de mananase

Para determinar a atividade enzimática foram feitas análises em triplicata de acordo com o sub-item 2.8 do Capítulo I, utilizando filtrado enzimático diluído em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 na proporção 1:10.

Os resultados foram expressos em  $\text{U g}^{-1}$  de matéria seca. No caso do estudo da influência de íons, foi expressa a atividade residual de mananase (percentagem - %) em relação ao extrato bruto sem a adição de íons metálicos.

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE MANANASE

### 2.6.1 Temperatura e pH

O extrato bruto enzimático foi submetido a diferentes condições de temperatura (40, 50, 60 e 70 °C) em banho-maria durante 10 minutos na condição de diferentes pHs: 3, 4 e 5 preparados com solução tampão citrato de sódio 50 mM; e 6, 7 e 8 com solução tampão fosfato de sódio 50 mM. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o sub-item 2.5.1.

### 2.6.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da reação enzimática

Os parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados após incubação durante 10 minutos a 50 °C do extrato bruto enzimático com diferentes concentrações (1 – 5 mg/mL) do substrato “*Locust Bean Gum*” (LBG). As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o sub-item 2.5.1. Os parâmetros foram calculados através do método Lineweaver-Burk.

### 2.6.3 Influência de íons metálicos na atividade da mananase

O extrato bruto enzimático foi incubado em temperatura ambiente durante 60 minutos com solução dos seguintes íons metálicos:  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , e  $Zn^{2+}$ . Os resultados das atividades de mananase foram determinados de acordo com o sub-item 2.5.1.

## 2.7 ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

### 2.7.1 Condições de armazenamento do extrato bruto enzimático

A estabilidade do extrato bruto de mananase frente a distintas condições e períodos de tempo foi avaliada.

Duplicatas das amostras armazenadas em microtubos do tipo Eppendorff foram utilizadas nas condições de armazenamento: temperatura ambiente ao abrigo da luz (em torno de 25 °C), sob refrigeração (4 °C), congelamento em “freezer” horizontal (-20 °C) e congelamento em “ultrafreezer” (-80 °C).

Nos intervalos de tempo de 120, 168, 240, 360 e 720 horas as amostras foram retiradas das suas respectivas condições de armazenamento, e a atividade mananolítica foi determinada conforme o sub-item 2.5.1.

### 2.7.2 Liofilização do extrato bruto enzimático

Para avaliar a capacidade de estabilização da enzima mananase, o extrato bruto enzimático foi misturado a diferentes substâncias e distribuído em mini-bandejas de papel alumínio as quais foram congeladas durante 24 horas a -80 °C, seguidas de processo de liofilização por 96 horas.

O extrato bruto enzimático foi congelado e liofilizado sozinho e com a adição de LBG ou leite em pó desnatado, ambos nas concentrações 1, 2 e 3%.

O pó liofilizado foi ressuspendido em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e a atividade de mananase foi determinada como descrito no sub-item 2.5.1.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO MANANOLÍTICO

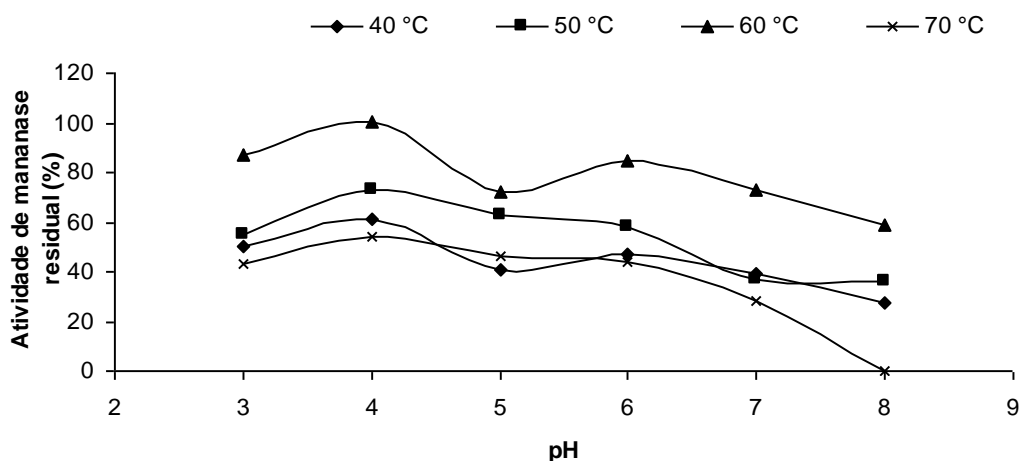
##### 3.1.1 Temperatura e pH

A Figura 1 apresenta um gráfico que relaciona a influência da temperatura na atividade de mananase sob diferentes pHs. É possível observar crescente produção de manose (o açúcar redutor gerado pela ação da mananase) com o aumento da temperatura até 60 °C.

Quando o extrato bruto é submetido a 70 °C, a produção de manose cai em todos os pHs empregados, provavelmente devido à desnaturação da mananase, com perda de sua configuração espacial, nessa elevada temperatura.

No gráfico fica também evidente que altas atividades enzimáticas ocorrem preferencialmente em condições ácidas (pHs 3 e 4). Os melhores resultados comparativos (100% de atividade de mananase), foram obtidos com pH 4 e 60 °C.

Nas condições alcalinas (pHs 7 e 8) a atividade residual de mananase decai chegando a 0 no pH 8 sob temperatura de 70 °C.



**Fig.1.** Efeito de diferentes pHs e temperaturas no extrato bruto de mananase; (atividade residual, %)

Esses resultados são comparáveis aos obtidos por Ademark et al. (1998) onde a melhor atividade de mananase foi observada em pH 3,5 com boa estabilidade a 50 °C.



Van Soest (1994) descreve como temperatura do rúmen aproximadamente 39 °C, e o pH variando entre 5,5 e 6,7, faixa em que a mananase produzida por *A. niger* LPB-28 resiste e apresenta satisfatória atividade.

As enzimas produzidas por fungos mesofílicos, como os *Trichoderma* e *Aspergillus* spp., normalmente possuem a temperatura ótima entre 45 e 60 °C, a qual é menor que as temperaturas encontradas durante os estágios mais avançados do processamento da silagem. Idealmente, as enzimas devem agir rapidamente durante o primeiro estágio crucial da ensilagem, antes delas começarem a ser inativadas termicamente (MARGESIN; SCHINNER, 1994). Contudo, silagens com elevadas temperaturas não são desejadas, pois elas vem sendo associadas com o crescimento indesejado de microrganismos como por exemplo, *Clostridium* sp. (FLYTHER; RUSSELL, 2004).

Colombatto et al. (2004b) demonstraram ainda, que as enzimas provenientes de microrganismos mesofílicos, preservam até 70% de sua atividade por 48 horas a 39 °C numa faixa de pH entre 4,0 e 6,8.

### 3.1.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima (V<sub>máx</sub>) da reação enzimática

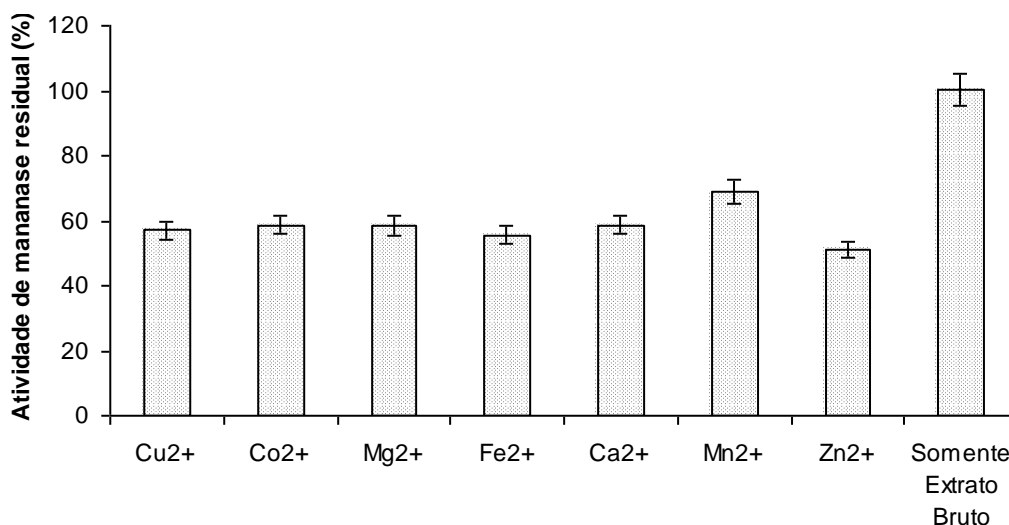
A reação enzimática pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten e, o Km e V<sub>máx</sub> foram determinados como 5,25 mg mL<sup>-1</sup> e 25 µmol min<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 3.1.3 Influência de íons metálicos na atividade da mananase

A atividade de mananase foi inibida por todas as soluções de íons metálicos utilizadas, mas o íon, Mn<sup>2+</sup> foi responsável pela menor inibição (em torno de 30%). Todos os outros íons ficaram na faixa de 40% de inibição (Figura 2).

O sulfato de manganês é um dos nutrientes utilizados na suplementação do meio fermentativo para a produção de mananase, e por isso, um teste sem adição de sulfato de manganês na composição da solução nutritiva seria interessante para

avaliar a necessidade deste elemento no crescimento do fungo *Aspergillus niger* LPB-28 e produção da mananase em casca de soja.



**Fig.2.** Efeito dos íons metálicos na atividade de mananase residual (%); porcentagem de erros fixada em 5%

Vieira et al. (2007) obtiveram inibição da atividade mananolítica pelos mesmos íons testados no presente estudo, com exceção de  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  que não foram avaliados pelos autores. Porém, no caso da mananase bacteriana (*Clostridium thermocellum*) parcialmente purificada, a atividade foi mais fortemente inibida por  $Cu^{2+}$ .

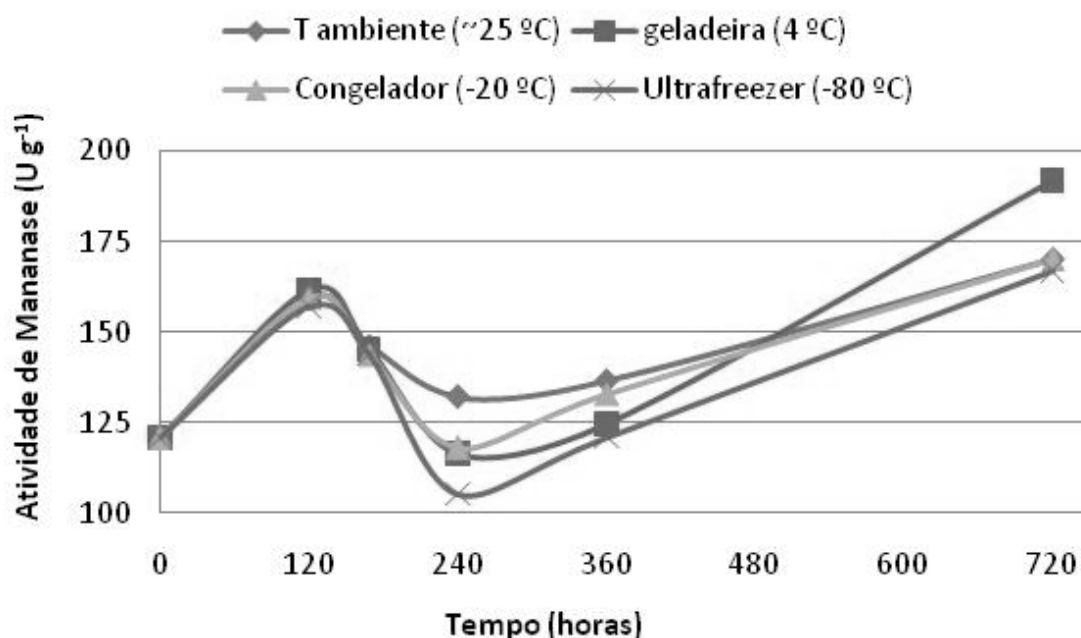
### 3.2 ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

#### 3.2.1 Condições de armazenamento do extrato bruto enzimático

A influência de diversas formas de armazenamento do extrato bruto enzimático foi avaliada num período total de 720 horas e os resultados estão dispostos no gráfico, apresentado na Figura 3.

Um perfil não esperado foi encontrado com o mesmo comportamento em todas as condições de armazenamento estudadas, entretanto, é possível observar que o extrato bruto foi capaz de manter sua atividade mananolítica ao final de 720

horas, em todas as condições de armazenamento estudadas (25, 4, -20 e -80 °C), sem perdas significativas da atividade mananolítica. A temperatura de -80 °C, que foi a condição mais extrema avaliada, se mostrou mais agressiva para a atividade da enzima ao longo do tempo.



**Fig.3.** Efeito na atividade de mananase ocasionado pelas diferentes condições de armazenamento do extrato bruto enzimático

Diante da análise do comportamento do extrato enzimático, sugere-se que seja realizado futuramente, um estudo com intervalos menores de modo a observar a se o perfil de estabilidade persiste. Porém, deve-se ressaltar que em todas as condições ocorreu um comportamento semelhante. Tal fato pode talvez mostrar que existe uma modificação da conformação da enzima com o passar do tempo e que esta mudança é favorável para a atividade enzimática após um período de 360 horas de armazenamento.

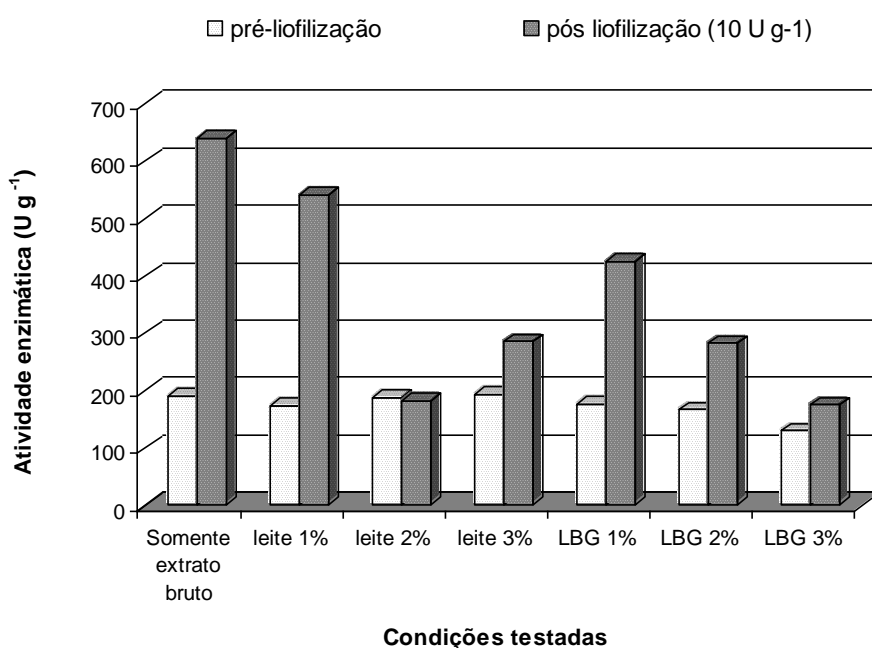
### 3.2.2 Liofilização do extrato bruto enzimático

A Figura 4 representa o resultado do processo de liofilização visando verificar o seu efeito de conservação da atividade de mananase. O procedimento se mostrou uma ferramenta eficiente para a concentração da atividade enzimática, pois na

maioria das condições testadas, a atividade mananolítica foi significativamente incrementada.

O extrato bruto de mananase liofilizado sem a adição de crioprotetor mostrou uma melhor atividade mananolítica ( $190 \text{ U g}^{-1}$  antes do processo de liofilização e  $6140 \text{ U g}^{-1}$  após a liofilização).

Leite em pó desnatado e LBG na concentração máxima de 1% foram outras duas condições satisfatórias ( $5408$  e  $4251 \text{ U g}^{-1}$ , respectivamente). De acordo com o gráfico, fica evidente que as concentrações de 2 e 3% de ambas substâncias não foram positivas para o processo de liofilização.



**Fig.4.** Efeito do processo de liofilização do extrato bruto enzimático na atividade de mananase ( $\text{U g}^{-1}$  e  $10 \text{ U g}^{-1}$ )

## 4 CONCLUSÕES

O extrato bruto enzimático de mananase apresentou preferência por temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e pHs 3,0 e 4,0, responsáveis pelo maior rendimento da atividade de mananase (87 e 100% respectivamente).

Na temperatura de  $70^\circ\text{C}$  há indícios de que a enzima foi desnaturada, pois sua atividade diminuiu consideravelmente.

O estudo da cinética enzimática permitiu a determinação de  $K_m$  ( $5,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e  $V_{\text{máx}}$  ( $25 \mu\text{mol min}^{-1}$ ).

Todos os íons metálicos testados ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , e  $\text{Zn}^{2+}$ ) inibiram em média 40% a atividade de mananase, sendo o íon  $\text{Mn}^{2+}$  o mais fraco inibidor (em torno de 30%).

No período de tempo estudado (720 horas) para armazenamento do extrato bruto mananolítico, a atividade enzimática se manteve estável em todas as condições de armazenamento avaliadas, sem perdas significativas.

O procedimento de liofilização do extrato bruto enzimático sozinho, sem adição de substância conservante, se mostrou uma excelente forma de concentrar a atividade da mananase ( $190 \text{ U g}^{-1}$  antes contra  $6140 \text{ U g}^{-1}$  após a liofilização).

## CAPÍTULO V

### ESTUDO DOS PROCESSOS DE ADSORÇÃO, RECUPERAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA MANANASE

#### RESUMO

A mananase é uma enzima que hidroliza as ligações  $\beta$ -1,4 em heteromananas presentes em diversas espécies vegetais. Esta enzima possui aplicação nos mais variados setores industriais e sua produção por fermentação no estado sólido, utilizando os mais diversos suportes e substratos é objeto de alguns estudos. Após as etapas de otimização do processo produtivo e caracterização da enzima desejada, estratégias de purificação são adotadas e dependem do uso a que se refere o produto final. Entretanto, para fins científicos, estudos de purificação da enzima são necessários para identificação e caracterização da molécula. Através de estratégias de ultrafiltração e cromatografia de troca iônica, o objetivo deste trabalho foi purificar a mananase produzida em condições otimizadas por *Aspergillus niger* LPB-28, através da fermentação no estado sólido (FES) usando cascas de soja como suporte e substrato, em escala laboratorial. Após a purificação da enzima, obtida com 11,06% de rendimento, e elucidada por uma banda protéica de aproximadamente 45 kDa obtida no gel de eletroforese SDS-PAGE, foi utilizado métodos de espectrometria de massa e análises de bioinformática para identificação da proteína apontada como endo- $\beta$ -1,4-mananase, pertencente à família 5 das glicosil hidrolases, e proveniente do fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

Palavras-chave: Endo- $\beta$ -1,4-mananase, Ultrafiltração, Cromatografia de troca iônica, Eletroforese, Espectrometria de massa (MALDI TOF-TOF).

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Neto (2001), o nível de purificação de uma enzima depende primariamente do uso a que se destina. Sendo assim, purificações destinadas a estudos acadêmicos são geralmente extensivas e somente pequenas quantidades de enzima ativa são necessárias; nestes casos custo e tempo têm importância secundária.

A escolha das técnicas de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima. Há um grande número de processos de separação que podem ser utilizados para o fracionamento e estes devem ser cuidadosamente planejados, preocupando-se com a manutenção da estabilidade da proteína, de forma a obter adequada eficiência, velocidade, rendimento e pureza (MARSHAK et al., 1996).

Substâncias secretadas por fungos e bactérias envolvidas em patogenias, sistema de defesa, e também na degradação de biomassa, possuem análises com foco na identificação de proteínas (Wymelenberg et al., 2005; Zorn et al., 2005).

Os fungos filamentosos, dentre eles, os ascomicetos como as espécies de *Aspergillus niger* estão entre os microrganismos mais importantes na indústria biotecnológica. Esta espécie detém uma longa história como microrganismo seguro para uso em aplicações agro-alimentares (Schuster et al., 2002), e dezenas de linhagens de *A. niger* que secretam enzimas estão sendo caracterizadas utilizando abordagens bioquímicas e moleculares (Tsang et al., 2009).

A multiplicidade de  $\beta$ -mananases extracelulares parece ser muito comum em vários fungos e, já são relatadas, por exemplo, em microrganismos como *Trichoderma reesei* (Stålbrand et al., 1993, 1995) e *Trichoderma harzianum* (TORRIE; SENIOR; SADDLER, 1990). Apesar da purificação de  $\beta$ -mananases a partir de *A. niger* já ser estudada há algum tempo, ainda não está esclarecido se mais de uma  $\beta$ -mananase é secretada (Tsang et al., 2009).

Através de estratégias de ultrafiltração e cromatografias de troca iônica, o objetivo deste trabalho foi purificar a mananase produzida em condições otimizadas por *Aspergillus niger* LPB-28, pela técnica de FES usando cascas de soja como suporte e substrato, em escala laboratorial. Após a purificação a enzima foi identificada utilizando-se métodos de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF

“*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*” e análises de bioinformática.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PRODUÇÃO DE MANANASE EM FES

Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 10 g de cascas de soja, adição de solução de uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1,0 g/L) para ajuste da umidade inicial de 70% e inoculação com uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* LPB-28 ( $1 \times 10^7$  esporos/g suporte-substrato). Os frascos foram incubados a 28 °C durante 96 horas.

### 2.2 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

Para obtenção do extrato bruto enzimático, o procedimento foi realizado de acordo com o sub-item 2.6 do Capítulo III.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### 2.3.1 Determinação da atividade de mananase

Para determinar a atividade enzimática foram feitas análises em triplicata de acordo com o sub-item 2.8 do Capítulo I, utilizando filtrado enzimático diluído em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 na proporção 1:10.

Os resultados foram expressos em U mL<sup>-1</sup>.



### 2.3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MANANASE

Os teores protéicos nas preparações enzimáticas da mananase foram determinados conforme descreve Bradford (1976). O protocolo foi adaptado para um volume final de ensaio de 200  $\mu\text{L}$ . A mistura de reação contendo 18,18  $\mu\text{L}$  de amostra e 181,81  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford foi deixada em repouso por 5 min ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm e a concentração de proteínas foi obtida por uma curva padrão com 0 – 0,1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). Os resultados para a atividade específica de mananase foram expressos em  $\text{U mg}^{-1}$  (unidades de atividade enzimática por mg de proteína).

### 2.4 OTIMIZAÇÃO DA ADSORÇÃO DA ENZIMA EM BATELADA

Estudos em batelada foram conduzidos para identificar as melhores condições para as etapas de cromatografia de troca catiônica e aniônica. Diferentes tampões sob diversos pHs e variações de diluição do extrato bruto enzimático foram testados para aperfeiçoar a adsorção da enzima em resinas de troca aniônica DEAE-Sepharose FF e catiônica SP-Sepharose FF (Pharmacia Biotech, Suécia). O extrato enzimático bruto foi diluído 1:2 (v/v), 1:3 (v/v), e 1:4 (v/v) em solução tampão Tris-HCl a 20 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 para os testes de adsorção em resina de troca aniônica DEAE-Sepharose FF. Para os testes de adsorção em resina de troca catiônica (SP-Sepharose FF), o extrato foi diluído 1:1 (v/v), e 1:2 (v/v) com solução tampão glicina-HCl a 25 mM pH 2,5, 3,0 e 3,5. Então, a atividade de mananase foi determinada ( $A$  = atividade inicial). As resinas DEAE-sepharose (fraco trocador aniônico) e SP-sepharose (forte trocador catiônico) (Pharmacia Biotech, Suécia) foram distribuídos igualmente em microtubos de centrífuga com capacidade para 2,0 mL. Quatro etapas, operando-se em batelada, foram realizadas: calibragem, carregamento, lavagem, e eluição.

#### 2.4.1 Calibragem

O primeiro passo consistiu em condicionar a resina de troca aniônica e catiônica em soluções tampão de Tris-HCl e Glicina-HCl nas proporções de resina/tampão 1:1(v/v), seguido de agitação sob diferentes condições (30 rpm / 30 minutos e 5000 rpm / 20 minutos, em temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pH foi mensurado.

#### 2.4.2 Carregamento

Os microtubos contendo as resinas equilibradas receberam 750  $\mu$ L das diferentes diluições do extrato bruto enzimático. O pH da mistura foi ajustado e submetido à agitação manual sutil durante 15 minutos para induzir a adsorção das proteínas protonadas. Os microtubos foram então centrifugados (10000 rpm / 5 minutos) e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, nomeado NA (NA = atividade de mananase na fração não adsorvida).

#### 2.4.3 Lavagem

750  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 6,0, 6,5 e 7,0, e tampão glicina-HCl 25 mM, pH 2,5, 3,0 e 3,5, respectivamente, foram adicionados ao material remanescente (resina DEAE ou SP + proteínas adsorvidas). Os microtubos foram sutilmente agitados e incubados durante 15 minutos a 4 °C e, em seguida, centrifugados a 10000 rpm / 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e identificados com a letra L (L = atividade de mananase no material lavado).

#### 2.4.4 Eluição

As proteínas adsorvidas nas resinas foram eluídas com a adição de 750  $\mu$ L de NaCl 1M no tampão correspondente. Após incubação sob sutil agitação durante 15

minutos a 4 °C, os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm / 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos nomeados E (E = atividade de mananase eluída).

Por fim, a resina foi regenerada conforme as instruções do fabricante, e armazenada em solução de etanol P.A. a 20%, sob refrigeração (4 °C).

As atividades mananolíticas das frações adsorvidas (A), não adsorvidas (NA) e eluídas (E) foram calculadas de acordo com as equações (1) e (2):

$$A [\%] = [I - (NAL + E)] \times 100 / I \quad (1)$$

$$E [\%] = E \times 100 / I \quad (2)$$

Onde:

A: atividade de mananase adsorvida

I: atividade inicial de mananase no extrato diluído

NAL= atividade de mananase na fração não adsorvida + atividade de mananase na fração lavado

E= atividade de mananase na fração eluída

## 2.5 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE MANANASE

### 2.5.1 Ultrafiltração

15 mL do extrato bruto enzimático foram adicionados sob as membranas do sistema e ultrafiltrados com auxílio de centrifugação dos tubos a 4500 rpm / 20 minutos / 4 °C, contendo os ultrafiltros (Millipore) modelos Amicon Ultra-10, Ultra-30, Ultra-50 e Ultra-100 contendo membranas de abertura de 30, 50 e 100 kDa, respectivamente. As amostras foram separadas e denominadas F (filtrado) e R (retido) para determinação da atividade de mananase através do método descrito anteriormente.

### 2.5.2 Cromatografia de troca aniônica (1ª. etapa)

O primeiro passo da purificação da mananase a partir do extrato bruto foi conduzido a 4 °C, utilizando colunas de vidro (35 mm x 300 mm) empacotadas com resina “*DEAE-Sepharose Fast Flow*” (Pharmacia Biotech, Suécia), um fraco trocador aniônico. A coluna foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM (pH 6,5) e carregada com 300 mL de extrato bruto de mananase diluído na proporção 1:2 no mesmo tampão. Em seguida, a coluna foi lavada para remoção de compostos não adsorvidos à coluna. Um formador de gradiente foi acoplado na coluna promovendo um gradiente linear de 0 a 0,5 M de NaCl ocasionando a eluição das proteínas adsorvidas. Esta etapa foi realizada com uma taxa de fluxo de 2 mL/min. Frações contendo 15 mL foram coletadas utilizando o coletor de frações automático (modelo SuperFrac - GE Healthcare, Suécia) e análises de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro à 280 nm foram conduzidas. As frações que obtiveram as maiores absorbâncias foram submetidas ao ensaio de determinação da atividade mananolítica e, as frações com as mais significativas atividades foram centrifugadas (4500 rpm/ 10 minutos/ 4 °C) em ultrafiltros de 10 kDa. As frações retidas foram armazenadas a 4 °C, até a realização da etapa seguinte.

### 2.5.3 Cromatografia de troca catiônica (2ª. etapa)

A segunda etapa da purificação da mananase também foi conduzida a 4 °C, utilizando uma coluna com capacidade para 10 mL de resina (15mm x 100mm), preenchida com resina “*SP-Sepharose Fast Flow*” (Pharmacia Biotech, Suécia), um forte trocador catiônico. A coluna foi pré-equilibrada com tampão glicina-HCl 20 mM (pH 3,7) e carregada com 30 mL do “*pool*” de enzimas obtido na cromatografia anterior (previamente ultrafiltrado em membrana de 10 kDa). Este “*pool*” foi diluído na proporção 1:2 no mesmo tampão. Em seguida, a coluna foi lavada para remoção dos compostos não adsorvidos à coluna. Um formador de gradiente foi acoplado à coluna promovendo um gradiente linear de 0 a 0,5 M de NaCl ocasionando a eluição das diferentes proteínas adsorvidas na coluna. Esta etapa foi realizada com uma taxa de fluxo de 2 mL/min. Frações contendo 5 mL de eluído foram coletadas em um coletor de frações automático (SuperFrac - GE Healthcare, Suécia) e analisadas

quanto à sua densidade óptica DO em espectrofotômetro à 280 nm. As frações que obtiveram as maiores absorbâncias foram submetidas ao ensaio para determinação da atividade mananolítica e dosagem de proteínas. As frações com máxima atividade obtida foram misturadas e centrifugadas (4500 rpm/ 10 minutos/ 4 °C) em ultrafiltros de 10 kDa. O volume retido foi armazenado a 4 °C.

## 2.6 SDS-PAGE

De acordo com Laemmli (1970), a análise eletroforética em SDS-PAGE (sódio dodecil sulfato poliacrilamida gel de eletroforese) foi realizada em gel de separação 10% (m/v), com 0,75 mm de espessura, produzido a partir de uma solução de acrilamida:bis-acrilamida 30:1. A amostra foi corrida em voltagem de 150V e o gel foi corado com azul de Coomassie R-250. O marcador molecular (modelo SM0431 - Fermentas) utilizado continha sete proteínas de massa molecular conhecida: 116,0 ( $\beta$ -galactosidase de *E. coli*), 66,2 (albumina sérica bovina de plasma bovino), 45,0 (ovoalbumina de ovos de galinhas brancas), 35,0 (lactato desidrogenase de músculo suíno), 25,0 (rease Bsp98I de *E. coli*), 18,4 ( $\beta$ -lactoglobulina de leite de vaca), e 14,4 (lisozima de ovos de galinhas brancas) kDa.

## 2.7 ESPECTOMETRIA DE MASSA (MALDI TOF-TOF)

Uma banda protéica obtida do SDS-PAGE foi submetida à digestão com tripsina (Promega, USA) pelo método adaptado de Shevchenko et al. (1996). Após incubação a 37 °C / 20 horas, alíquotas da amostra hidrolizada foram misturadas numa solução matriz HCCA " *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*", e pipetadas nas placas de MALDI onde permaneceram até completa secagem em temperatura ambiente. O espectro de massa (MS) foi adquirido utilizando o espectrofotômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) operando em modo refletivo e detecção de íons positivos com voltagem de aceleração de 20 kV. Alguns sinais presentes no espectro de massa MS foram submetidos à fragmentação em modo MS/MS LIFT refletivo positivo, a fragmentação foi induzida pela energia do laser LID "*laser induced dissociation*". Os picos foram convertidos em listas de

massas monoisotópicas com auxílio do programa computacional FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

## 2.8 IDENTIFICAÇÃO PROTÉICA (MANANASE)

A identificação de proteínas foi realizada utilizando comparação com o banco de seqüências público “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI<sup>nr</sup>) e o programa Mascot. A massa dos íons parentais tolerada foi de 100 ppm, com os critérios de pesquisa definidos em: erro parental (100 ppm), digestão com tripsina, 1 sítio de clivagem perdido, oxidação de metionina selecionada como variável de modificação, e erros de fragmentação de 0,5 Da.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 OTIMIZAÇÃO DA ADSORÇÃO DA ENZIMA EM BATELADA

Os melhores resultados desse estudo em batelada – uma maneira fácil e rápida de definir previamente os parâmetros de corrida da cromatografia iônica -, são apresentados na Tabela 1.

As duas condições apresentadas, na mesma diluição, são responsáveis pelas melhores respostas na recuperação da mananase adsorvida nas resinas avaliadas (100% em DEAE e 30,5% em SP-sepharose).

O estudo em microtubos para troca aniônica adsorveu 100% na resina DEAE-sepharose com igual percentual de recuperação da enzima, estágio no qual o valor de atividade mananolítica em  $\text{U mL}^{-1}$  foi insignificamente superior à atividade inicial (3,53 contra  $3,36 \text{ U mL}^{-1}$ ). Esta diferença provavelmente deve-se a erros analíticos e, portanto, considerou-se 100% de recuperação, uma vez que foram analisadas duplicatas e ambas apresentaram a mesma atividade.

Para troca catiônica a mananase adsorvida chegou a 90,2% e 30,5% de atividade mananolítica inicial, tendo sido recuperada com 1M de NaCl na etapa de eluição com a resina SP-sepharose.

**Tabela 1.** Resultados sumarizados do estudo em batelada para identificação das condições adequadas nas resinas DEAE e SP-sepharose para cromatografia de troca iônica

Tampão	Diluição do extrato bruto	Fração	DEAE-Sephrose		SP-Sephrose	
			Atividade enzimática* (U mL <sup>-1</sup> )	(%)	Atividade enzimática* (U mL <sup>-1</sup> )	(%)
20 mM Tris-HCl pH 6,5	1:2	I	3,36	100	-	-
		A	3,36	100	-	-
		NAL	0	0	-	-
		E	3,53	100	-	-
25 mM glicina-HCl pH 3,5	1:2	I	-	-	7,23	100
		A	-	-	6,52	90,2
		NAL	-	-	0,71	9,8
		E	-	-	2,21	30,5

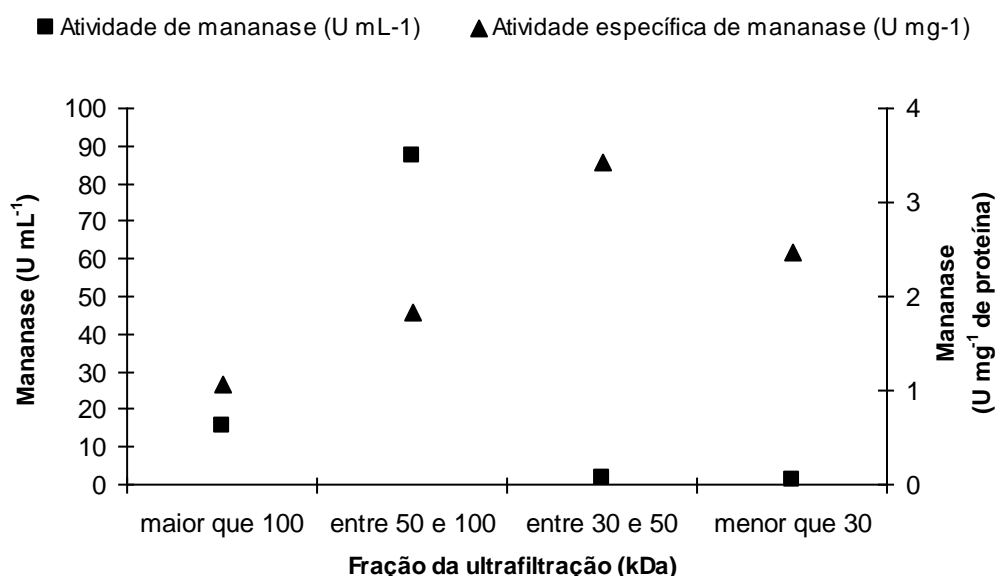
I (atividade mananolítica inicial); A (atividade mananolítica adsorvida); NAL (ativ. mananase na fração não adsorvida e na fração lavagem) E (atividade mananolítica eluída); \*valor médio de atividade

Como a recuperação em microtubo de troca aniônica se mostrou muito mais eficiente do que a troca catiônica, primeiramente decidiu-se aplicar o extrato bruto enzimático para purificar apenas na resina DEAE-sepharose. Porém, uma análise eletroforética realizada (dado não apresentado) demonstrou que esta etapa não foi suficiente para purificar a mananase, já que inúmeras bandas protéicas apareceram no gel e, portanto, as duas estratégias foram utilizadas em colunas cromatográficas na etapa seguinte (sub-item 3.3).

### 3.2 ULTRAFILTRAÇÃO PARA SEPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO POR FAIXA DE MASSA MOLECULAR

Uma ultrafiltração com várias porosidades capaz de separar as moléculas encontradas no extrato bruto enzimático, por tamanho molecular (kDa) foi realizada e, pode ser observada na Figura 1. A mesma indica que o tamanho da molécula de mananase está possivelmente entre 30 e 100 kDa.

Foi nos volumes encontrados nesta faixa que a maior atividade enzimática (87 U mL<sup>-1</sup> na fração entre 50 e 100 kDa) e a melhor atividade mananolítica específica (3 U mg<sup>-1</sup> de proteína na fração entre 30 e 50 kDa) foram obtidas, entretanto, para a confirmação do tamanho molecular da mananase produzida, são necessários estudos complementares.



**Fig.1.** Ultrafiltração do extrato bruto enzimático para separação da mananase

Esta etapa pode ser uma estratégia importante para eliminar substâncias de maior peso molecular (>100 kDa), substâncias de pequeno peso molecular (<30 kDa) e ainda concentrar o extrato enzimático, o que pode ser interessante para a aplicação da enzima em produtos ou processos que não necessitem da mananase pura.

### 3.3 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA PARA PURIFICAÇÃO DA MANANASE

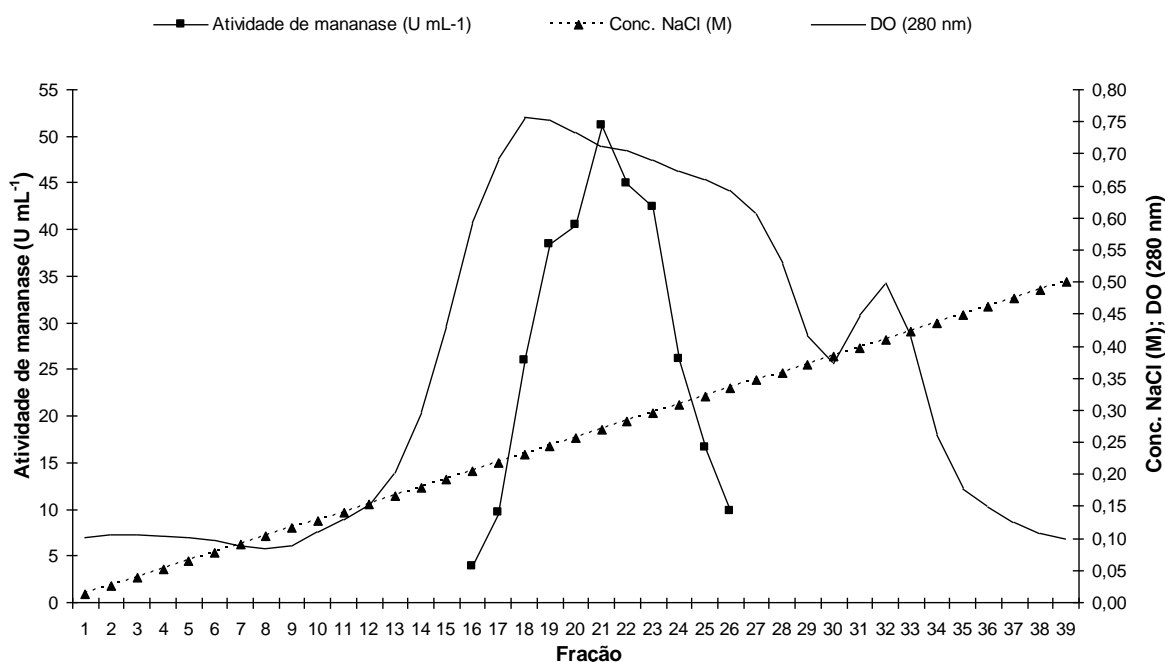
Vários estudos têm demonstrado que apenas uma etapa de purificação não é capaz de purificar a mananase (Ademark et al., 1998, FERREIRA; FILHO, 2004, Gübitz et al., 1996a, Gübitz et al., 1996b, Jiang et al., 2006, MAGALHÃES; MILAGRES, 2009, Puchart et al., 2004, SACHSLEHNER; HALTRICH, 1999, ZAKARIA; YAGI, 1998).

Portanto, o primeiro passo adotado para este fim, foi submeter a fração ultrafiltrada com o maior teor de atividade mananolítica (entre 50 kDa e 100 kDa) à cromatografia de troca aniônica utilizando-se a resina DEAE-sepharose.

Trinta e nove frações foram coletadas e analisadas. O ensaio para a determinação da atividade de mananase foi realizado apenas com as frações que apresentaram as maiores absorbâncias para a densidade óptica (frações 16 a 26),



como mostra a Figura 2, onde é possível observar ainda o gradiente de eluição dessa etapa de purificação.

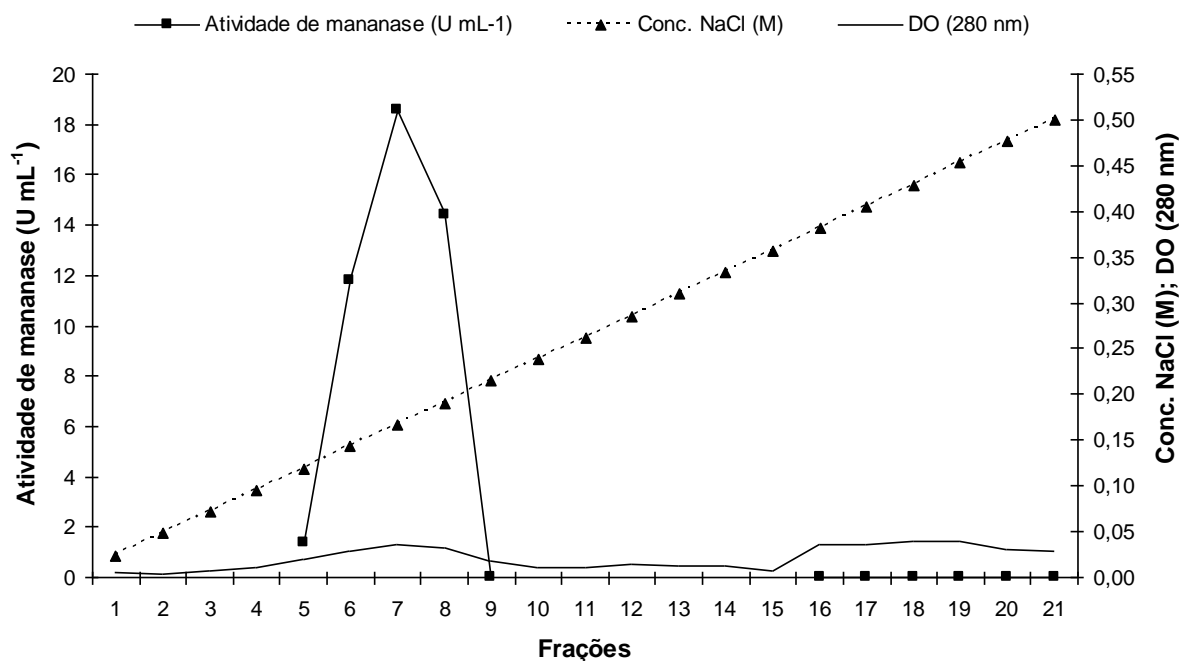


**Fig.2.** Cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-sepharose, apresentando o pico de atividade mananolítica, densidade óptica (DO) e gradiente linear de eluição

A melhor fração (21) obtida nessa 1ª etapa foi aplicada na coluna com a resina SP-sepharose para troca catiônica (2ª etapa), onde as frações 5 – 9, e 16 – 21 foram analisadas.

Na Figura 3 é possível comprovar que o primeiro pico, referente às maiores densidades ópticas, corresponde à presença de mananase. Já um segundo pico, seguido por um platô obtido na densidade óptica (frações 16 – 21) também foi avaliado quanto à produção de mananase, mas nenhuma atividade foi observada. A elevação de DO destas frações, provavelmente está relacionada à presença de outras proteínas.

A queda de densidade óptica apresentada nesta etapa é devida ao fato da amostra já ter sofrido uma pré-purificação (coluna cromatográfica de troca aniônica).



**Fig. 3.** Cromatografia de troca catiônica em resina SP-sepharose, apresentando os picos de atividade mananolítica, densidade óptica (DO) e gradiente linear de eluição

Após a cromatografia de troca aniônica, a atividade específica de mananase foi de 845 U mg<sup>-1</sup>, o que equivale ao incremento de 4 vezes após a etapa de ultrafiltração (211 U mg<sup>-1</sup>), e 5 vezes em relação ao extrato bruto (166 U mg<sup>-1</sup>).

Após a última etapa de purificação (cromatografia de troca catiônica), foi obtido uma fração contendo 18,55 U mL<sup>-1</sup> de atividade mananolítica, totalizando 92,7 U, o que representou um rendimento de 11,06% na purificação desta enzima.

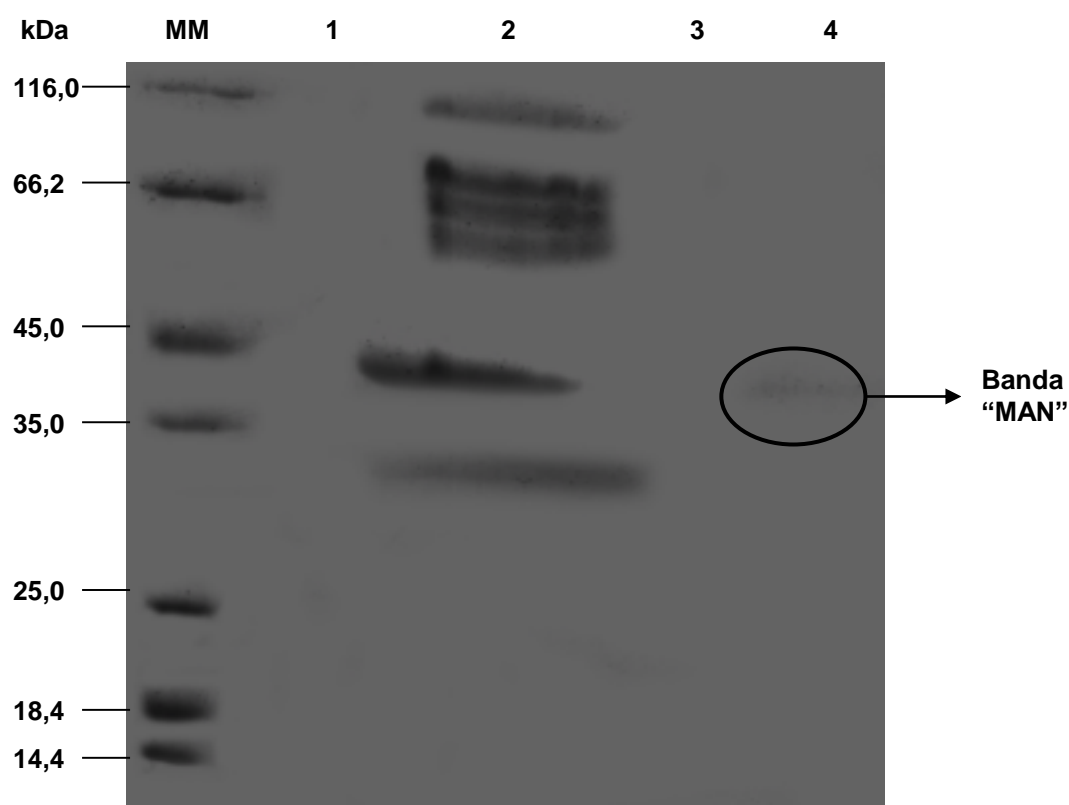
Caso a etapa de ultrafiltração para a recuperação e concentração da atividade mananolítica fosse realizada com a fração entre 30 e 50 kDa, é possível que o rendimento obtido fosse superior à fração utilizada (entre 50 a 100 kDa), porém, esta afirmação só poderá ser feita após a cromatografia de troca iônica realizada com tal fração.

### 3.4 ELETROFORESE SDS-PAGE

O gel obtido na eletroforese SDS-PAGE (Figura 4) apresenta as bandas protéicas obtidas da fração 21 (poço 2) e da fração 7 (poço 4), nas etapas de purificação por cromatografia de troca iônica com as resinas DEAE e SP-sepharose, respectivamente.

Após a cromatografia de troca aniônica, o gel apresentou 6 bandas, um número relativamente pequeno, que indica que esta primeira etapa foi efetiva, entretanto, insuficiente para a purificação.

Uma única banda protéica foi observada após a cromatografia de troca catiônica (poço 4) apresentou-se na mesma posição que a mais intensa das bandas localizadas no poço 2. Tal banda foi nomeada MAN, e apresentou tamanho aproximado de 45 kDa corroborando com o resultado obtido na ultrafiltração que indicava um tamanho aproximado entre 30 e 100 kDa.

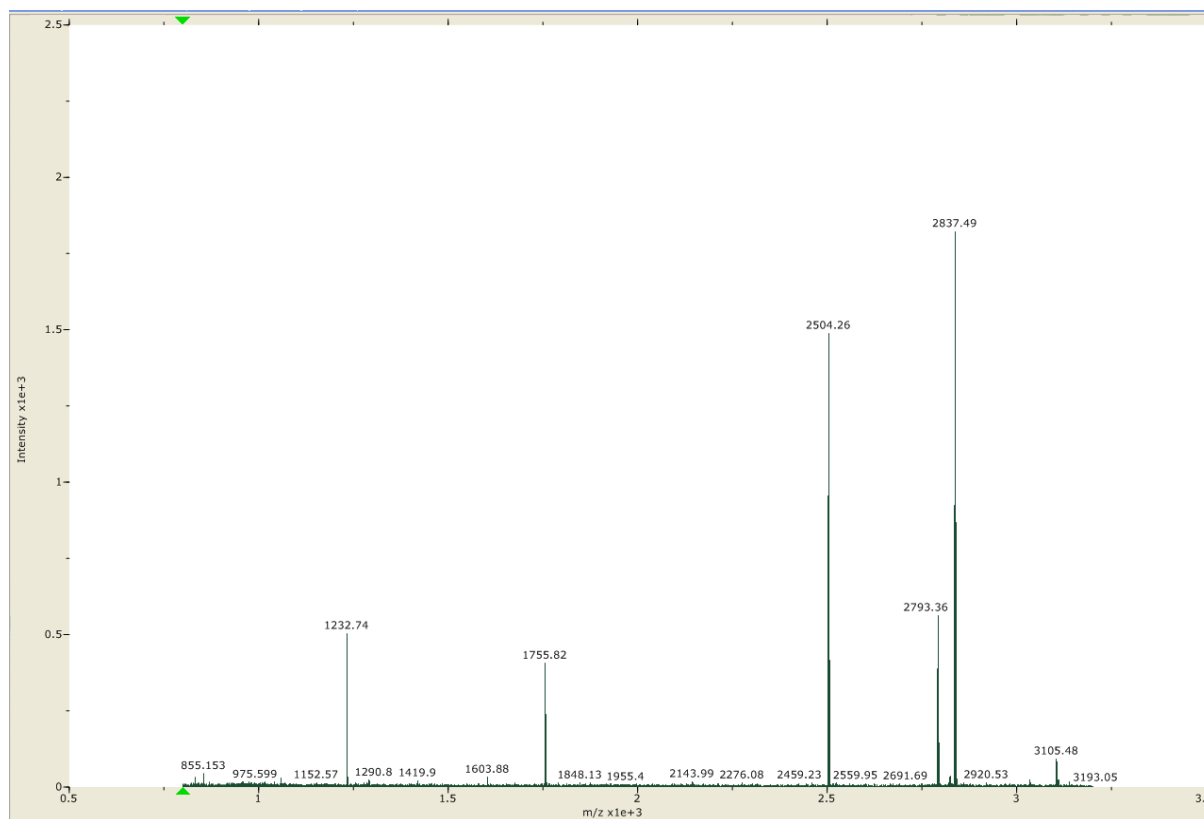


**Fig.4.** Análise SDS-PAGE da mananase produzida por *A. niger* LPB-28 e purificada em resina DEAE-sepharose (poço 2), e SP-sepharose (poço 4). O poço nomeado MM corresponde aos marcadores moleculares (Fermentas) utilizados: 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; e 14,4 kDa

### 3.5 ESPECTRO DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO PROTÉICA

Objetivando identificar os polipeptídeos da mananase, a banda protéica MAN foi submetida à digestão com tripsina e análise por MALDI-TOF. Conforme apresentado na Figura 5, os cinco sinais mais intensos no espectro MS (1232,74;

1755,82; 2504,26; 2793,36 e 2837,49) foram submetidos à fragmentação e análise MS/MS.



**Fig. 5.** MS espectro de massa dos polipeptídeos derivados da digestão com tripsina da banda protéica MAN

Os espectros MS/MS foram combinados e submetidos a buscas utilizando o programa Mascot no modo “*MS/MS ion search*”. Esta análise identificou uma endo- $\beta$ -1,4-mananase de *Aspergillus niger* pertencente a família 5 de glicosil hidrolases. (número de acesso NCBI: gi210077419) apresentada na Figura 6, e um produto gênico não identificado do mesmo organismo (Figura 7) com número de acesso NCBI: gi145236118, ambos com Mascot “*ion score*” de 245, sendo que valores acima de 51 indicam identidade ou extensiva homologia ( $p < 0,05$ ).

## Protein View

Match to: **gi|210077419** Score: **245**

**endo-beta-1,4-mannanase** [*Aspergillus niger*]

Found in search of modelo MS MS.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **37640**; Calculated pI value: **4.27**

NCBI BLAST search of [gi|210077419](#) against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: *Aspergillus niger*

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **17%**

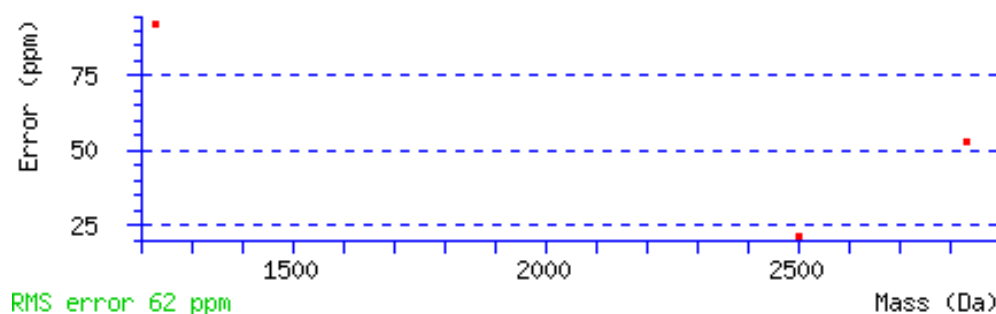
Matched peptides shown in **Bold**

```

1  SFASTSGLQF TIDGETGYFA GTNSYWIGFL TDNADVLDLM GHLKSSGLKI
51 LRVWGFNDVT SQPSSGTVWY QLHQDGKSTI NTGADGLQRL DYVVSSAEQH
101 DIKLIINFVN YWTDYGGMSA YVSAYGGSSE TDFYTSDTMQ SAYQTYIKTV
151 VERYSNSSAV FAWELANEPR CPSCDTSVLY NWIEKTSKFI KGLDADRMVC
201 IGDEGFGLNI DSDGSYPYQF SEGLNFTMNL DIDTIDFGTL HLYPDSWGTS
251 DDWGNGWITA HGAACKAAGK PCLLEEYGVV SNHCSVEGAW QKTALSTTGV
301 GADLEFWQYGD DLSTGKSPDD GNTIYYGTSD YQCLVTDHVA AIGSA

```

Start-End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
53-77	2836.48	2835.47	2835.32	53	0	<b>R. VWGFNDVTSQPSSGTVWYQLHQDGK. S</b> ( <u>score 77</u> )
78-89	1232.73	1231.72	1231.61	93	0	<b>K. STINTGADGLQ. L</b> ( <u>score 45</u> )
293-316	2503.25	2502.24	2502.19	21	0	<b>K. TALSTTGVGADLEFWQYGD</b> <b>DLSTGK. S</b> ( <u>score 123</u> )

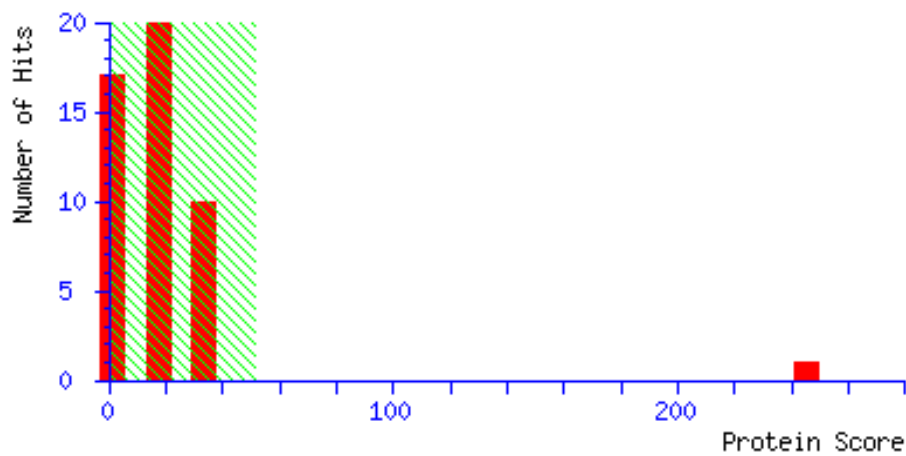


**Fig.6.** Panorama protéico obtido para gi210077419 comparando os espectros MS/MS obtidos a partir de MS 1232,74; 2504,26 e 2837,49

MS data file : modelo MS MS.txt  
Database : NCBIInr 20100529 (11111565 sequences; 3786451707 residues)  
Timestamp : 2 Jun 2010 at 20:55:15 GMT  
Protein hits : gi|145236118 unnamed protein product [*Aspergillus niger*]

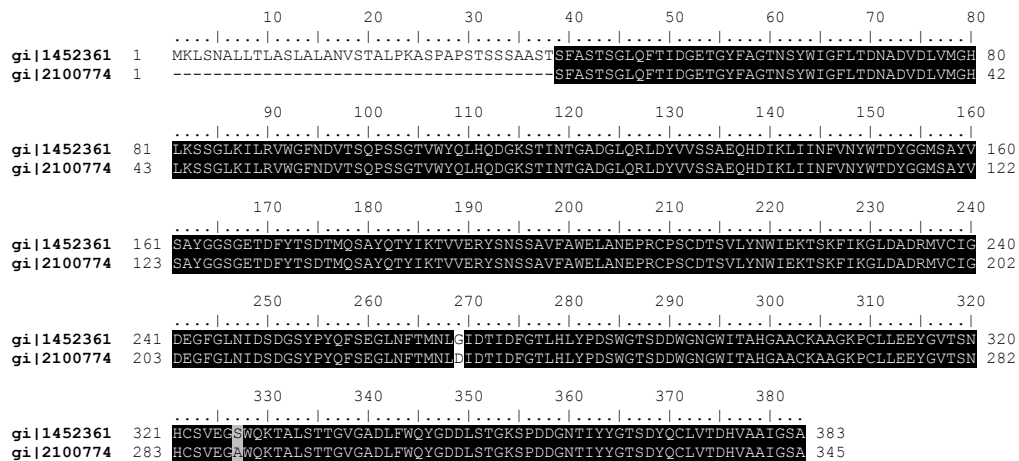
**Mascot Score Histogram**

Ion score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ion scores  $> 51$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Fig.7.** “Ion score” (245) para o produto gênico gi145236118 identificado apenas como proteína de *Aspergillus niger*

Uma comparação entre as duas seqüências indicou que provavelmente se trata do mesmo produto gênico já que as duas são idênticas, com exceção da substituição do resíduo G269D, S327A e do fato da seqüência gi210077419 estar truncada na porção N-terminal (Figura 8).



**Fig.8.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos entre os dois produtos gênicos obtidos: gi2100774 e gi1452361

A massa molecular teórica obtida para gi210077419 foi de 41,2 kDa e está de acordo com a massa experimental determinada por SDS-PAGE para a mananase produzida, que foi de aproximados 45 kDa (Figura 4). Tais características são similares à mesma enzima produzida por *Aspergillus niger* (40 kDa) como descreve Ademark et al. (1998) e, também, como a mananase recombinante de *Pichia pastoris* e *Aspergillus sulphureus* (41.3 kDa) no estudo de Chen et al. (2007). Zakaria, Yamamoto e Yagy (1998) apresentam massa molecular de 40 kDa para a  $\beta$ -mananase produzida por *Bacillus subtilis*, e Gübitz et al. (1996a), massa molecular de 41.0 kDa para mananase proveniente da espécie fúngica *Sclerotium rolfsii*.

#### 4 CONCLUSÕES

Os testes de cromatografias de troca aniônica e catiônica nas condições obtidas do estudo em batelada, com a amostra diluída a 1:2 e ajustada a pH 6,5 para estudos utilizando a resina DEAE-sepharose e pH 3,7 para os testes com a resina SP-sepharose, demonstrou ser uma alternativa simples e eficiente para otimizar a performance dessa etapa de purificação do extrato bruto enzimático e recuperação da mananase.

Com rendimento final de 11,06% de enzima após as etapas de purificação, a ultrafiltração seguida pela cromatografia de troca aniônica (DEAE-sepharose) e posterior cromatografia de troca catiônica (SP-sepharose) mostraram-se estratégias eficientes para purificação da mananase, comprovado através da única banda protéica revelada no poço 4 do gel de eletroforese SDS-PAGE, a qual apresentou massa molecular aproximada de 45 kDa.

Com o procedimento de espectro de massa submetido à pesquisa iônica foi possível confirmar a purificação da molécula de mananase produzida por *Aspergillus niger* LPB-28 e identificá-la como uma endo- $\beta$ -1,4-mannanase pertencente à família 5 de glicosil hidrolases.

Para se afirmar o tamanho da molécula de mananase, testes complementares serão necessários uma vez que duas moléculas com tamanhos aproximados (41,2 e 37,6 kDa) foram apontadas como mananase e proteína não identificada de *Aspergillus niger* (provável mananase), respectivamente.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

- *Aspergillus niger* LPB-28 foi selecionado como a melhor linhagem produtora de mananase;
- *Aspergillus niger* NRRL-599 foi a segunda melhor linhagem produtora de mananase;
- Cascas de soja foram escolhidas como suporte e substrato para produção de mananase por FES apresentando as características ideais;
- A adição de “*Locust Bean Gum*” ao meio fermentativo não se mostrou efetivamente indutivo na produção de mananase;
- O período compreendido em 144 horas foi determinado como o ideal para interromper o crescimento do inóculo de *A. niger* LPB-28;
- A solução tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 foi a escolhida para extrair a mananase do meio fermentativo (1:10) sob 20 minutos de homogeneização;
- A solução nutritiva ideal foi composta por sulfato de manganês (1,0 g/L) e uréia (0,7 g/L);
- As melhores condições de FES foram definidas em 70% de umidade inicial e pH 5,0, o qual não foi quimicamente ajustado pois valores próximos a este é o são obtidos naturalmente pelo próprio processo fermentativo;
- O extrato bruto de mananase se mostrou mais estável a 60 °C e pH 4,0, preferindo condições ácidas;
- Por 720 horas o extrato bruto mananolítico manteve a sua atividade em todas as temperaturas avaliadas (25, 4, -20 e -80 °C), sem perdas significativas;



- O extrato bruto de mananase foi inibido por todas as soluções de íons metálicos testadas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , e  $\text{Zn}^{2+}$ ;
- A  $K_m$  de  $5,25 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $V_{\text{máx}}$  de  $25 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$  foram obtidos para a mananase bruta;
- O processo de liofilização se mostrou uma excente forma de concentrar a atividade da mananase (antes:  $190 \text{ U g}^{-1}$  depois:  $6140 \text{ U g}^{-1}$ );
- *A. niger* LPB-28 produziu além de mananase, celulasas (CMCase:  $42 \text{ U g}^{-1}$  e FPase:  $14 \text{ U g}^{-1}$ ), xilanase ( $942 \text{ U g}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -galactosidase ( $7,4 \text{ U g}^{-1}$ );
- Uma redução de 72 horas no processo fermentativo de produção da mananase foi obtido após o estudo cinético;
- Aeração por difusão foi melhor do que a aeração forçada para a produção de mananase em FES com casca de soja;
- Ultrafiltração e cromatografia de troca iônica (usando as resinas DEAE-sepharose pH 6,5 e SP-sepharose pH 3,7, respectivamente) se mostraram eficientes procedimentos para a purificação da mananase;
- A enzima produzida por *A. niger* LPB-28 foi identificada como endo- $\beta$ -1,4-mananase pertencente a família 5 das glicosil hidrolases com massa molecular aproximada de 41,2 kDa.

## 5 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. B.; ACHARYA, D. K.; MODI, H. A. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4147-4152, 2008.
- ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPÄÄ, V.; DRAKENBERG, T.; TJERNELD, F.; STÅLBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 199–210, 1998.
- AJISAKA, K.; MATSUO, I.; ISOMURA, M.; FUJIMOTO, H.; SHIRAKABE, M.; OKOWA, M. Enzymatic synthesis of mannobioses and mannotrioses by reverse hydrolysis using alpha-mannosidase from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 270, p. 123-130, 1995.
- AJISAKA, K.; FUJIMOTO, H.; NISHIDA, H. Enzymic synthesis of disaccharides by use of the reversed hydrolysis activity of  $\beta$ -D-galactosidases. **Carbohydrate Research**, v. 180, p. 35-42, 1988.
- ALAZARD, D.; RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 113–117, 1981.
- AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**, 15th ed. Gaithersburg, MD: AOAC Inc press, 1990.
- ARAUJO, A.; WARD, O. W. Purification and some properties of the mannanases from *Thielavia terrestris*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 269-274, 1990.
- ARAUJO, A.; WARD, O. W. Studies on the galactomannan-degrading enzymes produced by *Sporotrichum cellulophilum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 229-236, 1991.
- ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KRISTUFEK, D.; KUBICEK, C. P. Purification, and characterization of a  $\beta$ -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 58-62, 1993.
- ASENJO, J.A. **Separation process in biotechnology**, Nova York: Marcel Dekker, 1990.
- Associação Brasileira das Indústrias de óleos vegetais (ABIOVE): Soja Plus. Disponível em: <[http://www.abiove.com.br/sustent/sojaplus\\_sobre\\_br\\_mai10.pdf](http://www.abiove.com.br/sustent/sojaplus_sobre_br_mai10.pdf)>. Acesso em 05/09/2010.
- ASPINNAL, G. O. **Polysaccharides**. New York: Pergamon Press Ltd., 1980, p. 103–115.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-271, 1992.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. Nova York: John Wiley & Sons, 1988.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.
- BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. **Hemicellulose and Hemicellulases**. London: Portland, 1993, p. 29–51.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substances, microorganisms, enzymes, and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90–104, 1981.

BRACHT A.; ISHII-IWAMOTO E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri, SP: Manole, 2003.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 127–133, 2000.

BUCHERT, J.; SALMINEN, J.; SIIKA-AHO, M.; RANUA, M.; VIIKARI, L. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching. **Holzforschung**, v. 47, p. 473– 478, 1993.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45–50, 2000.

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 273–277, 1998.

CHAHAL, D. S. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulases production. **American Chemistry Society Symposium Series**, v. 207, p. 421–442, 1987.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 295–331, 1998.

CHANG, M. C. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n6, p. 677–684, 2007.

CHEN, X.; CAO, Y.; DING, Y.; LU, W.; LI, D. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus*  $\beta$  -mannanase in *Pichia pastoris*, **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 452–461, 2007.

CHRISTGAU, S.; KOFOD, L.V.; ANDERSEN, L.N.; KAUPPINEN, S.; HELDI-HANSEN, H.P.; DALBOEGE, H. **An enzyme exhibiting mannanase activity**. WO 94/25576, 1994.

CIVAS, A.; EBERHARD, R.; LE DIZET, P.; PETEK, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. **Biochemistry Journal**, v. 219, p. 857-863, 1984.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628–2638, 2003.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Animal Feed Science Technology**, v. 111, p. 111–128, 2004a.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science Technology**, v. 111, p. 145–159, 2004b.

COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production – review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211–219, 2005.

DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 277–352, 1976.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, p. 341–376, 1978.

DHAWAN, S.; KAUR, J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, p. 197–216, 2007.

DIAS, J. C. C. A.; SANTIAGO, G. S.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. O. S.; NARANJO, A. P. Avaliação da estabilidade *in vitro* de uma protease comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n.6, p. 618–622, 2002.

DONALD, W. W.; MIROCHA, C. J. Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed. **Cereal Chemistry**, v. 54, p. 466–474, 1977.

DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 341–6, 1988.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3639, p. 1–13, 2002.

EL-HELOW, E. R.; SABRY, S. A.; KHATTAB, A. A. Production of  $\beta$ -mannanase by *B. subtilis* from agro-industrial by-products: screening and optimization. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 71, p. 189–193, 1997.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa soja). Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)>. Acesso em 05/09/2010.

FENG, P.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; NG, W. J. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum  $\beta$ -mannanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 282–289, 2003.

FERREIRA, C. R.: Utilização da espectrometria de massas para controle de qualidade de meios de cultivo e do soro fetal bovino utilizado para a produção *in vitro* de embriões bovinos. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/projetospipe/970/utilizacao-espectrometria-massas-controle-qualidade-meios/>>. Acesso em: 05/09/2010.

FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 23–29, 2004.

FLYTHER, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade aminoacids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 215–222, 2004.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85–101, 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R. da, GOMES, E. Review Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.

GRAY, K. A.; ZHAO, L. Emptage M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n2, p. 141–146, 2006.

GRIFFIN, D. M. Water and microbial stress. **Advances in Microbial Ecology**, v. 5, p. 91–136, 1981.

GRIGELMO-MIGEUL, N.; MARTIN-BELLOSO, O. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. **Food Research International**, v. 31, p. 355–36, 1999.

GÜBITZ, G. M.; HAYN, M.; SOMMERAUER, M.; STEINER, W. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: characterization and synergism of two endo  $\beta$ -mannanases and a  $\alpha$ -mannosidase. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 127–135, 1996a.

GÜBITZ, G. M.; SCHNITZHOFFER, W.; BALAKRISHNAN, H.; STEINER, W. Two mannanases from *Sclerotium rolfsii* in total chlorine free bleaching of softwood kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 181–188, 1996b.

GÜBITZ, G. M.; HALTRICH, D.; LATAL, B.; STEINER, W. Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 47, p. 658–662, 1997.

GUISAN, J. M.; RODRIGUEZ, V.; SOLER, G.; SANTANA, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; BASTIDA, A. Syntheses of pharmaceutical oligosaccharides catalysed by immobilized-stabilized derivatives of different beta-galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 84, p. 373–379, 1993.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 45–47, 1998.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982.

HARJUNPÄÄ, V.; TELEMAN, A.; SIIKA-AHO, M.; DRAKENBERG, T. Kinetic and stereochemical studies of manno-oligosaccharide hydrolysis catalysed by  $\beta$ -mannanases from *Trichoderma reesei*. **Eur. J. Biochem.**, v. 234, p. 278–283, 1995.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**. 5. ed. Oxford: IRL Press, 1994.

HARRISON, R. G.; TODD, P.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. New York: Oxford University Press, 2003.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 417–423, 2005.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781–788, 1993.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structure Biology**, v. 7, p. 637–44, 1997.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301–306, 2005.

Importação e Comércio do Paraná (Imcopa). Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/?p=empresa/soja>>. Acesso em 05/09/2010.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201004\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201004_5.shtm)>. Acesso em 28/05/2010.

JIANG, Z.; WEI, Y.; LI, D.; LI, L.; CHAI, P.; KUSAKABE, I. High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 88–96, 2006.

JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T. BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 851–86, 2003.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A.; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and xylanases: Progress in Biotechnology**. New York: Elsevier, 1992, p. 1-15.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGHE L. P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J.-L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale**. Bioresource Technology, aceito para publicação.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 493-522.

KIRK, O.; BORCHER, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.

KUBICEK, C. P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R. L.; KUBICEK-PRANZ, E. M. The *Trichoderma cellulase* regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 90–99, 1993.

KUNG, J.L.: The role of fiber in ruminant ration formulation. Disponível em: <[http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/articles/role\\_of\\_fiber\\_in\\_ruminant\\_ration.htm](http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/articles/role_of_fiber_in_ruminant_ration.htm)>. Acesso em 04/09/2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGE, N. K. In: SUOMINEN, P.; REINIKAINEN, T. *Trichoderma reesei*: cellulases and other hydrolases. **Helsinki: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research**, 1993, p. 263-272.

LASS, T. Electrophoresis in gels. In: JANSON, J.-C.; RYDÉN, L. **Protein purification**. Nova York: VCH Publishers, 1989. p. 349-375.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

LIN, T.; CHEN, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1103–1109, 2004.

LU, W.; LI, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis on pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 305–311, 2003.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnol. Tecch.**, v. 13, n.2 p. 149-154, 1999.

MACHADO, C. M. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – ga3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de ga3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersiicum esculentum*)**. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2002. 95 p.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. 129 p.

MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Biochemical properties of a  $\beta$ -mannanase and a  $\beta$ -xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 191–195, 2009.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. J. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.** v. 15, p. 804-816, 1999.

MANZANARES, P.; GRAAFF L. H. & VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 383-390, 1998.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 1–14, 1994.

MARGOLLES-CLARK, E.; ILMEN, M.; PENTTILÄ, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 167–179, 1997.

MARSHAK, D.R.; KADONAGA, J.T.; BURGESS, R.R.; KNUTH M.W.; BRENNANW.A.; LIN S. **Strategies for protein purification and characterization – laboratory course manual**. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MEDEIROS, A.B.P.; CHRISTEN, P.; ROUSSOS, S.; GERN, J.C.; SOCCOL, C.R. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 245-248, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 28/05/2010.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 137–147, 2003.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 165–178, 2008.

MORETTO, L. D. **Efeito da temperatura e de ativadores no processo de extração da bromelina**. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, 1992. 98 p.

MUNOZ, G. A.; AGOSIN, E.; COTORAS, M.; SAN MARIN, R.; VOLPE, D. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 63–70, 2005.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NESS, W. R. The biochemistry of plant sterols. In: PAOLETTI, R.; KRITCHEVSKY, D. **Advances in Lipid Research**. New York: Academic Press, 1977, p. 233-324.

NETO, J. B. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 377-390.

NICOLAS, P.; RAETZ, E.; REYMOND, S.; SAUVEGEAT, J-L. **Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized  $\beta$ -mannanase**. US 5714183, 1998.

NIGAM, P. SINGH, D. Solid state substrate fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, v. 34, p. 405-414, 1994.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 283– 285, 1998.



OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA, B. M.; NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1710-1714, 2007.

OOI, T.; KIKUCHI, D. Purification and some properties of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus* sp.. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 310-314, 1995.

PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosic bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biological Technology**, v. 41, p. 379 – 390, 1998.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149–162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. **Bioresources Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGHAM, P. **Solid State Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications**. Asiatech Publishers Inc., 2001.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. General and fundamental aspects of SSF - Introduction. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 3.

PASCUAL, S.; DE CAL, A.; MAGAN, N.; MELGAREJO, P. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 847–853, 2000.

PEL. H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221–231, 2007.

PESSOA JR. A.; KILIKIAN B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

Portal Veterinária: Soja na Ração. Disponível em: <<http://www.farmacia.med.br/veterinaria/artigos/2501/usos-da-casca-de-soja-na-nutricao-de-animal>>. Acesso em 05/09/2010.

PRIEST, F. G. **Extracellular enzymes**. Londres: Van Nostrand Reinhold, 1984.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMICKÝ, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRŠANSKÁ, M. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 355–361, 1999.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; ÖGEL, Z. B.; BIELY, P. Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, p. 239–250, 2004.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives, **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161–179, 2006.

RASTALL, R. A.; REES, N. H.; WAIT, R.; ADLARD, M. W.; BUCKE, C. Alpha-mannosidase-catalysed synthesis of novel manno-, lyxo-, and heteromanno oligosaccharides: a comparison of kinetically and thermodynamically mediated approaches. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 53–57, 1992.

RÄTTÖ, M.; POUTANEN, K. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 10, p. 661–664, 1988.

RAY, S.; PUBOLS, M. H.; MGGINNIS, J. The effect of a purified guar degrading enzyme on chicken growth. **Poultry Science**, v. 61, p. 488–494, 1982.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 284–289, 2001.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197–203, 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos – uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão, 2005.

RODRIGUES, C.; SOCCOL, C. R. **Tecnologia Enzimática**. Curitiba: SENAI, 2009.

RODRIGUES, C. **Produção, extração e purificação de hormônio vegetal (ácido giberélico) por fermentação no estado sólido em polpa cítrica e utilização do extrato fermentado em meio de cultivo de bromélias *in vitro***. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2010. 178 p.

ROUSSOS, S.; ANGELES-AQUIPAHUATL, M. de los; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GAIME-PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp — isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 756–762, 1995.

SACHSLEHNER, A.; HALTRICH, D. Purification and some properties of a thermostable acidic endo- $\beta$ -1,4-D-mannanase from *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 47–55, 1999.

SANADA, C. T. N. **Produção de  $\alpha$ -galactosidase a partir de vinhaça de soja**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2009. 94 p.

SANDGREN, M.; SHAW, A.; ROPP, T. H.; WU, S.; BOTT, R.; CAMERON, A. D. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 295–310, 2001.

SANT'ANNA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362

SANTOS, M. M.; ROSA, A. S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D. A.; KRIGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresources Technology**, v. 93, p. 261–268. 2004.

SAUCEDO-CASTANEDA, G.; TREJO-HERNANDEZ, M. R.; LONSANE, B. K.; NAVARRO, J. M.; ROUSSOS, S.; DUFOUR, D. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. **Process biochemistry**, v. 29, p. 13-24, 1994.

SCHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, J. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202-1203, 1979.

SERMANI, G. G.; TISO, N. Aspects of design of bioreactors in SSF. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. 1 ed. New Delhi: Springer, 2008. p.117-144.

SES - Secretaria de Estado da Saúde. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985; 523.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219–228, 2003.

SHEEHAN, J.; HIMMEL, M. E. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and Development activities for ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 817–827, 1999.

SHIMADZU: Princípios de MALDI/TOF – MS. Disponível em: <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/biotech/maldi-teoria.aspx>>. Acesso em 05/09/2010.

SHOBHA, M. S.; KUMAR, V. A. B.; THARANATHAN, R. N.; KOKA, R.; GAONKAR, A. K. Modification of guar galactomannan with the aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydrate Polymers**, v.62, p. 267–73, 2005.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v.32, 2009.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, P. S. Overview of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-18, 2003.

SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid state fermentation process. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 412.

SINGH, S. K.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production of enzymes. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. 1 ed. New Delhi: Springer, 2008. p.181-204.

SOCCOL, C. R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2000. Poços de Caldas, p. 83-98. Disponível em: <[www.sbicafe.uf.br/sbicafe/publicacao/frpublicacao.asp](http://www.sbicafe.uf.br/sbicafe/publicacao/frpublicacao.asp)>. Acesso em: 25/10/2007.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2005. 155 p.

STÅLBRAND, H.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. Purification and characterization of two  $\beta$ -mannanases from *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 229-242, 1993.

STÅLBRAND, H.; SALOHEIMO, A.; VEHMAANPERÄ, J.; HENRISSAT, B.; PENTTILÄ, M. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase gene containing a cellulose binding domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1090–1097, 1995.

STEINER, J.; SOCHA, C.; EYZAGUIRRE, J. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p. 280–4, 1994.

STURM, W.; DERGINT, D. E. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Instrumentation and control in SSF. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. 1 ed. New Delhi: Springer, 2008. p.146-168.

STURM, W. **Sensores industriais: conceitos teóricos e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 2004.

SUURNÄKKI, A.; CLARK, T.A.; ALLISON, R.W.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. Mannanase-aided bleaching of softwood kraft pulps. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. **Biotechnology in the pulp and paper industry: recent advances in applied and fundamental research**. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996. p. 69 – 74.

SZAKACS, G. **Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation**. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, Clermont-Ferrand, France. 2004. v. 1. p. 20

TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. **J. Ind. Eng. Chem**, 1914, 6, p. 824-828.

TAUBKEN, N.; SAUERBREI, B.; THIEM, J. Synthesis of beta-mannopyranosides by enzymatic approaches. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 651-667, 1993.

TECHAPUN, C.; SINSUWONGWAT, S.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Production of a cellulase-free xylanase from agricultural waste materials by a thermotolerant *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1685–1689, 2001.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 169–179, 2003.

TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Science and Technology**, v. 1, p. 45–70, 1967.

TOLAN, J. S.; FOODY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 41–67, 1999.

TOMOTARI, M. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263–268, 1990.

TORRIE, J. P.; SENIOR, D. J.; SADDLER, J. N. Production of  $\beta$ -mannanase by *Trichoderma harzianum* E58. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 303–307, 1990.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2005.

TSANG, A.; BUTLER, G.; POWLOWSKI, J.; PANISKO, E. A.; BAKER, S. E. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 153–160, 2009.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175–178, 2000.

Van SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**, 2nd ed. New York: Cornell Univ. Press, 1994.

Van ZYL, W. H.; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GORGENS, J. F. Fungal  $\beta$ -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203–1213, 2010.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

VIEIRA, W. B.; MOREIRA, L. R. S.; MONTEIRO, A.; FERREIRA, E. X. Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 237–242, 2007.

VIESTURS, U. F.; ASPITE, A. F.; LAUKEVIES, J. J.; OSE, V. P.; BEKERS, M. J. Solid state fermentation of wheat straw with *Chaeromium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 359–369, 1981.

VRIES, R. P. de, VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497–522, 2001.

VRIES, R. P. de. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 10–20, 2003.

WARD, O. **Biotecnología de la fermentación: principios, procesos e productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p. 64-67; 233-247.

WARD, O. P.; MOO-YOUNG, M. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8, p. 237– 74, 1989.

WYMELENBERG, A. V.; SABAT, G.; MARTINEZ, D.; RAJANGAM, A. S.; TEERI, T. T.; GASKELL, J.; KERSTEN, P. J.; CULLEN, D. The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 17–34, 2005.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

WOOD, T. M. Properties of cellulolytic enzyme systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, p. 407–410, 1985.

XU, J.; TAKAKUWA, N.; NOGAWA, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 718–24, 1998.

YAMAZAKI, N.; SINNER, M.; DIETRICH, H. H. Isolierung und eigenschaften einer  $\beta$ -1,4-Mannanase aus *Aspergillus niger*. **Holzforschung**, v. 30, p. 101–109, 1976.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T. dos; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C. da; SILVA, K. T. da; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 937-943, 2001.

ZAKARIA, M. M.; YAMAMOTO, S.; YAGI, T. Purification and characterization of an endo-1,4- $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 158, p. 25-3, 1998.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17–34, 2001.

ZORN, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, v. 5, p. 4832–4838, 2005.

## 6 ANEXOS

### 6.1 CÁLCULOS

6.1.1 Cálculo para determinação do volume de suspensão de esporos a ser inoculada (taxa de esporos =  $1 \times 10^7$ /g de matéria seca)

Nº de esporos contados na câmara de Neubauer x fator de diluição utilizado = Y esporos (1)

Y esporos -----  $4 \times 10^{-6}$  mL (volume da câmara de Neubauer)

X esporos ----- 1 mL (2)

Supondo que  $Y = 105$ :

X será = 26.250.000 esporos/mL ou  $2,6 \times 10^7$  esporos/mL

Então, se:

1 mL -----  $2,6 \times 10^7$  esporos

X mL -----  $1 \times 10^7$  esporos

X = 0,38 mL de suspensão de esporos para se obter a taxa de  $1 \times 10^7$  esporos/g de matéria seca

### 6.1.2 Cálculo para determinação da umidade final da amostra fermentada

A determinação da umidade da amostra fermentada, da qual é obtido o extrato bruto para análise da atividade enzimática, foi realizada utilizando balança analítica:

$$\frac{[(\text{massa do papel filtro}^*) + (\text{massa inicial do fermentado}) - (\text{massa do fermentado seco}^{**}) \times 100]}{\text{massa inicial do fermentado}} = \% \text{ de umidade da amostra fermentada} \quad (1)$$

\* O papel filtro deve suportar entre 3 e 5 gramas de fermentado e portanto, o tamanho aproximado foi de 7 x 7 cm;

\*\* O fermentado é seco em estufa com temperatura entre 80 e 100 °C durante 48 horas, e levado ao dessecador até atingir T ambiente, para então ser pesado.

### 6.1.3 Cálculos para determinação da atividade enzimática (mananase, xilanase e celulasas)

(média da absorbância da amostra) – (média da absorbância da enzima) – (média da absorbância do substrato) = absorbância da atividade enzimática (1)

Onde:

Enzima	Amostra	Enzima	Substrato
<b>Mananase</b>	substrato LBG 0,5% + extrato enzimático	extrato enzimático + solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0	solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 + substrato LBG 0,5%
<b>Xilanase</b>	substrato “ <i>birchwood xylan</i> ” 1% + extrato enzimático	extrato enzimático + solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0	solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 + substrato “ <i>birchwood xylan</i> ” 1%
<b>CMCase (endoglucanase)</b>	substrato carboxi-metil-celulose 2% + extrato enzimático	extrato enzimático + solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0	solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 + substrato carboxi-metil-celulose 2%
<b>FPase (exocelulase)</b>	substrato papel filtro (1 x 6 cm) + extrato enzimático	extrato enzimático + solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0	solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 + substrato papel filtro (1 x 6 cm)

Se por exemplo,

a absorbância da atividade enzimática for igual a 0,1035;

a equação da reta da curva padrão for:  $y = 1,0477x$  (com absorbâncias no eixo **x** e, as várias concentrações da solução padrão no eixo **y**);

e a umidade da amostra fermentada foi de 72,7%;

Teremos:

Abs. da ativ. enzim.	mg/mL	g/mL	mol/mL	U ou $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$	U ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	% Umidade	U $\text{g}^{-1}$
0,1035	0,108437	0,0001084	6,01892E-07	0,601892	0,60189248	72,7	2,205

Onde:

**mg/mL** =  $1,0477 \times$  absorbância da atividade enzimática

**g/mL** = resultado obtido na coluna “mg/mL” / 1000

**mol/mL** = resultado obtido na coluna “g/mL” x o peso molecular do açúcar\* utilizado na composição da curva padrão

**U ou  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$**  = resultado obtido na coluna “mol/mL” x 1.000.000

**U ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )** = (resultado obtido na coluna “ $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ” x fator diluição utilizado na obtenção da amostra para o ensaio enzimático) / minutos de incubação da amostra com o substrato

**U  $\text{g}^{-1}$**  = (resultado obtido na coluna “U ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )” x 100) / (100 – a porcentagem de umidade da amostra fermentada)

\* Manose para mananase, glicose para celulasas e, xilose para xilanase.



#### 6.1.4 Cálculos para determinação da atividade enzimática específica

$$(\text{média da absorbância da amostra}) - (\text{média da absorbância do reativo de Bradford}) = \text{absorbância da atividade enzimática específica} \quad (1)$$

*Se por exemplo,*

a absorbância da atividade enzimática específica for igual a 0,085;

a equação da reta da curva padrão for:  $y = 2,13x$  (com as várias concentrações da solução padrão no eixo **x** e, absorbâncias no eixo **y**);

e a umidade da amostra fermentada foi de 72,7%;

*Teremos:*

<b>Abs. da ativ. enz. específica</b>	<b>mg/mL</b>	<b>% Umid.</b>	<b>mg/g</b>	<b>U g<sup>-1</sup></b>	<b>U mg<sup>-1</sup></b>
0,085	0,399	71	1,37	2,205	<b>1,609</b>

*Onde:*

**mg/mL** = (absorbância da atividade enzimática específica x fator diluição utilizado na obtenção da amostra para o ensaio enzimático) / (2,13)

**mg/g** = (resultado obtido na coluna mg/mL x 100) / (100 – a porcentagem de umidade da amostra fermentada)

**U mg<sup>-1</sup>** = (resultado obtido na coluna U g<sup>-1</sup>) / (resultado obtido na coluna mg/g)